DADE BEHRING

Enzygnost® Anti-HAV

Enzyme immunoassay for the detection of antibodies to hepatitis A virus antigen in serum and plasma

Enzymimmunoassay zum Nachweis von Antikörpern gegen Hepatitis A-Virus-Antigen in Serum und Plasma

Test immunoenzymatique pour la mise en évidence des anticorps anti-antigène du virus de l'hépatite A dans le sérum et le plasma

Metodo immunoenzimatico per l'identificazione degli anticorpi contro l'antigene del virus dell'epatite A nel siero e nel plasma

Ensayo inmunoenzimático para el reconocimiento de los anticuerpos contra el antígeno virus de la hepatitis A en sueros y plasmas humanos.

Teste imunoenzimático para detecção de anticorpos contra o antígeno do vírus da hepatite A no soro e no plasma

English:	Page	2	to	9
Deutsch:	Seite	10	bis	17
Français:	Pages	18	à	25
Italiano:	Pagina	26	fino	33
Español	Página	34	hasta	41
Português:	Página	42	a	49

Summary of Test Procedure	Page	9
Kurzanleitung Testdurchführung	Seite	17
La technique en bref	Page	25
Istruzioni in breve, esecuzione del Test	Pagina	33
Resumen de la técnica	Página	41
Resumo da técnica	Página	49

Bibliography/Literatur/Littérature
Bibliografia/Bibliografía/Bibliografia Page/Seite/Pagina/Página 50

Edition March 2003

Enzygnost® Anti-HAV

Intended Use

Enzyme immunoassay for the detection of antibodies to hepatitis A virus antigen in serum and plasma. The processing of the enzyme immunoassay is done with the BEP® II, BEP® III and BEP® 2000 ELISA Processors. The test was developed for testing individual samples, not for pooled or diluted samples. The product is for *in vitro* diagnostic use only.

Summary and Explanation

The onset of hepatitis A (1, 2, 3, 4) is always accompanied by detectable and usually high levels of anti-HAV. A negative result for a patient therefore excludes hepatitis A as a cause of illness. After an infection, anti-HAV remains detectable for a lifetime, so that detection of anti-HAV is indicative of current immunity, an essential criterion in deciding whether to supply active immunization by vaccination or to administer immunoglobulins for post-exposure prophylaxis in at-risk contacts.

Using the Anti-HAV Standard Serum (calibration curve) for quantitative evaluation, Enzygnost® Anti-HAV enables the HAV antibody levels to be quantified and expressed in IU/L based on the WHO international standard.

Principle of the Method

Enzygnost® Anti-HAV is an enzyme immunoassay based on the competitive test principle.

The specific antibodies contained in the test sample and the POD-conjugated monoclonal antibodies to HAV compete for the binding sites on the HAV antigen which is likewise contained in a reagent added to the one-step assay. The quantity of conjugate which can be bound to the antigen depends on the concentration of the specific antibody in the sample.

The resulting immune complex binds to the HAV-specific antibodies bound to the surface of the microtitration plate.

After the unbound components are removed by washing, the bound enzyme activity of the conjugate is measured. The enzymatic reaction of the substrate and chromogen (blue color reaction) is stopped by the addition of Stopping Solution POD (yellow color reaction). The color intensity is inversely proportional to the concentration of antibodies in the sample.

Reagents

Materials provided

Enzygnost® Anti-HAV	*1 x 96*
Enzygnost® Anti-HAV Test Plate	1 pcs.
Anti-HAV/POD Conjugate	1 x 0.4 mL
Conjugate Buffer (Anti-HAV)	2 x 6 mL
HAV Antigen	2 x 6 mL
Anti-HAV Standard Serum 80	1 x 0.5 mL
Anti-HAV Control Serum, negative	1 x 6 mL
Washing Solution POD (concentrate)	1 x 100 mL
Buffer/Substrate TMB	1 x 30 mL
Chromogen TMB	1 x 3 mL
Stopping Solution POD	1 x 100 mL
Empty bottle for Working Chromogen Solution	1 pcs.
Adhesive foils	6 pcs.
Polyethylene bag for storing unused test strips	1 pcs.
Barcode table of assigned values	1 pcs.
Instructions for use	1 pcs.

Composition

Enzygnost® Anti-HAV (Test Plate)

Microtitration plate coated with human antibodies to hepatitis A virus antigen.

Anti-HAV/POD Conjugate
Anti-HAV monoclonal (mouse), peroxidase (POD) conjugate, in Tris buffer solution (0.05 mol/L)
Working dilution: 1 + 40 in conjugate buffer (Anti-HAV)
Preservative: Phenol (max. 1 g/L)

Conjugate Buffer (Anti-HAV) to be used as a diluent for Anti-HAV/POD Conjugate:

contains glycerin (100 g/L), Tween 20 (20 g/L), sodium chloride (8.8 g/L), EDTA (1.9 g/L), bovine albumin (1 g/L), polygeline and phosphate (50 mmol/L)

Preservative: Phenol (max. 1 g/L)

HAV Antigen:

Hepatitis A virus antigen from human fibroblasts, inactivated

Preservative: Phenol (max. 1 g/L)

Anti-HAV Standard Serum 80:

Human serum containing antibodies to HAV (nominal value 80 ± 20 IU/L), based on the WHO Reference Preparation.

Nominal absorbance value ≤ 0.3 A

Preservative: Phenol (max. 1 g/L)

Anti-HAV Control Serum, negative:

Human serum without antibodies to HAV

Nominal absorbance value ≥ 0.7

Preservative: Phenol (max. 1 g/L)

Washing Solution POD (concentrate)**:**

Phosphate buffer solution (90 mmol/L containing Tween (18 g/L)

Preservative: Phenol (max. 1 g/L)

Buffer/Substrate TMB:

Hydrogen peroxide (approximately 0.1 g/L) in acetate buffer solution (25 mmol/L)

Preservative: n-butanol (max. 1 %)

Chromogen TMB:

Tetramethyl benzidine dihydrochloride (5 g/L)

Stopping Solution POD: 0.5 N sulfuric acid

The pack contains a matched set of reagents. Reagents must not be interchanged with other kits unless the reagents are from an identical lot (i.e. they must display the required 6-digit lot numbers printed on the pack and given in the enclosed barcode table). Washing Solution POD, Stopping Solution POD and Working Chromogen Solution are exceptions to this requirement. Note that the Working Chromogen Solution must first be prepared from matched components (do not use Chromogen TMB and Buffer/Substrate TMB from kits with a different number).

Warnings and Precautions

1. For *in vitro* diagnostic use only.
2. Each individual blood donation intended for use in the manufacture of standard and control sera, is tested for HBsAg, Anti-HCV, Anti-HIV1 and Anti-HIV2. Only donations with negative findings were used for manufacture. Nevertheless, since absence of infectious agents cannot be proven, all materials obtained from human blood should always be handled with due care, observing the precautions recommended for biohazardous material (5).
3. The HAV antigen isolated from human fibroblasts is subjected to an accepted virus inactivation procedure (reaction with β-propiolactone). Nevertheless, to ensure safety, the HAV antigen should be handled with care (5).
4. It is advisable to wear protective gloves throughout the entire test procedure.
5. It is recommended that solid materials be disinfected by autoclaving for at least one hour at +121 °C. All aspirated liquids should be collected in two receptacles connected in series. The receptacles should contain a disinfectant suitable for inactivating pathogenic human viruses. The concentrations and reaction times specified by the manufacturer must be observed.

Preparations of the Reagents

Pre-warm all reagents and test samples to +18 to +25 °C before testing. Do **not** remove the test plates from the container while doing this.

For each test plate, dilute **20 mL of Washing Solution POD** (concentrate) with **400 mL** distilled or deionized water.

Working Chromogen Solution: For each test plate, dilute **1 mL of Chromogen TMB** with **10 mL of Buffer/Substrate TMB** in the empty bottle supplied with the kit and store closed and protected from light.

Rinse the bottle thoroughly with distilled water after use.

For technical reasons (overfill), it is not permissible to pour together the full contents of the Chromogen TMB vial and the full contents of the Buffer/Substrate TMB vial.

For the **quantitative test,** the following dilutions of the Anti-HAV Standard Serum 80 must be prepared using the **Anti-HAV Control Serum, negative**:

40 IU/L: dilute 1:2 (e. g. 100 µL Anti-HAV Standard Serum 80 + 100 µL Anti-HAV ControlSerum, negative).

20 IU/L: dilute 1:4 (e. g. 100 µL of the 40 IU/L standard + 100 µL Anti-HAV Control Serum, negative).

10 IU/L: dilute 1:8 (e. g. 100 µL of the 20 IU/L standard + 100 µL Anti-HAV Control Serum, negative.

In the case of **sera or plasma** samples with expected **Anti-HAV concentrations of ≥ 60 IU/L,** the samples must be diluted as follows:

Up to 600 IU/L: dilute 1:11 (e. g. 10 µL sample + 100 µL Anti-HAV Control Serum, negative).

Up to 6000 IU/L: dilute 1:101 (e. g. 10 µL sample + 1000 µL Anti-HAV Control Serum, negative).

Up to 60 000 IU/L: dilute: 1:1,111 (e.g. 10 µL sample + 1 000 µL Anti-HAV Control Serum, negative; then 10 µL thereof + 100 µL Anti-HAV Control Serum, negative).

All the necessary dilutions must be prepared using only the relevant Anti-HAV control serum, negative.

Working Conjugate Solution: Withdraw the necessary volume of Anti-HAV/POD Conjugate and dilute 1 + 40 with Conjugate Buffer (Anti-HAV). [For each test plate add 150 µL Anti-HAV/POD Conjugate to an original vial (6 mL) of Conjugate Buffer (Anti-HAV)].

Storage and Stability

Stored unopened at +2 to +8 °C, all components of the Enzygnost® Anti-HAV test kit may be used up to the date of expiry given on the labels.

For complete stability and storage data for reagents that have been opened or diluted for use, see Table 1 in the Appendix.

Equipment Required

BEP® II:	For automatic dispensing of reagent and washing
BEP® III:	For automatic processing of the test after dispensing the samples as well as for evaluation.
BEP® 2000:	For fully automatic processing and evaluation of the test
Pipettes:	Piston-type pipettes 25, 50, 100 and 1000 µL
Incubator:	Covered water bath (+37 ± 1 °C)

Procedure

Procedure for the BEP® II

1. **Pipetting scheme:**

   Ascertain the number of wells required (number of samples to be investigated plus 6 wells for controls). Remove from the holder any strips which are not required for the test and store for later use (See Table 1 for stability data).

   For the quantitative test, prepare a standard curve (see preparatory work) from concentrations determined in duplicate (in this case, the number of wells required is given by the number of samples to be investigated plus 12 wells for controls and the standard series).

2. **Dispense samples:**

   Qualitative Test: Pipette 25 µL/well of Anti-HAV Control Serum, negative into 4 wells (A1 to D1), 25 µL Anti-HAV Standard Serum 80 into 2 wells (E1 and F1) and 25 µL/well into the subsequent wells.

   As an alternative to the above pipetting scheme, it is also possible to pipette the Anti-HAV Standard Serum 80 once at the start and once at the end of the series.

   Pipetting scheme: Pipette 25 µL/well of Anti-HAV Control Serum, negative, into 4 wells, 25 µL Anti-HAV Standard Serum 80 into the next well, and then fill the following wells with 25 µL/well of sample. At the end of the series / plate, pipette 25 µL of Anti-HAV Standard Serum 80 once more.

   Quantitative Test: Pipette 25 µL/well of Anti-HAV Control Serum, negative into 4 wells (A1, A2, B1 and B2) and then 25 µL/well Anti-HAV Standard Serum into 2 wells each per dilution, i.e. 80 IU/L into wells C1 and C2, 40 IU/L into wells D1 and D2, 20 IU/L into wells E1 and E2 and 10 IU/L into wells F1 and F2. Then dispense 25 µL/well of sample into the subsequent wells (predilute if necessary).

   After completing the sample dispensing step, proceed immediately to the antigen dispensing step.

3. **Dispense Antigen**

   Add 50 µL antigen solution to each well with previously dispensed sample, and proceed immediately to the conjugate dispensing step.

4. **Dispense Conjugate**

   Add 50 µL of working conjugate solution to each well (see Note), seal the test plate with foil and place immediately in the incubator.

   Note:

   If the test is performed manually, to avoid falsified results the conjugate must be dispensed in such a manner that the tip of the pipette does not touch the edges of the wells and does not contact the sample.

5. **Incubation**

   Incubate for 2 hours ± 5 minutes at +37 ± 1 °C. Proceed immediately to the wash step.

6. **Wash**

   Remove the foil; aspirate all the wells and wash 4x with approximately 0.3 mL/well of washing solution. After completing the wash cycles, proceed immediately to the next reagent dispensing step (otherwise the wells may dry out).

7. **Dispense Substrate**

   Pipette 100 µL of the Working Chromogen Solution into each well and cover the plate with fresh foil.

8. **Incubate**

   Incubate at +18 to +25 °C for 30 ± 2 minutes, protected from light.

9. **Stop reaction**

   Remove the foil and add 100 µL of Stopping Solution POD to each well, keeping to the same timing as in "7. Dispense Substrate".

10. **Read**

    Measure in the photometer at 450 nm within one hour. The recommended reference wavelength is 650 nm, or if necessary, between 615 and 690 nm.

Procedure for the BEP® III:

If the test is processed using the BEP® III, the test plates must be prepared up to the sample dispensing step (Items 1 to 2 in the section entitled "Test Procedure for the BEP® II"). All the subsequent processing steps are then performed fully automatically in the instrument (see BEP® III Instruction Manual). Do not seal the plates with foil. Once the samples are dispensed, place the test plate immediately in the BEP® III.

The settings for the incubation times in the BEP® III software may differ from the times on the BEP® II for technical reasons (system speed) but have been validated for Enzygnost® on the BEP® III.

Procedure for the BEP® 2000

The sample dispensing steps and subsequent processing of the test are performed fully automatically by the analyzer (see BEP® 2000 Instruction Manual).

Validation

The individual absorbance readings for the control sera are used to calculate the mean absorbance values if

$$A_{neg.} \geq 0.700$$

$$-0.010 \leq A_{ST80} \leq 0.300$$

If one of the absorbance values of the Anti-HAV Control Serum, negative, is outside the limit, this value can be neglected.

Both absorbance values of the Standard Serum 80 must comply. If these conditions are not fulfilled, the test must be repeated.

Evaluation

The evaluations take place automatically if using the BEP® 2000 or the BEP® III. Please consult the relevant instruction manuals. The following sections apply if the measurements are carried out without using a software.

Qualitative Test

Calculate the mean absorbance value of the Anti-HAV Control Serum, negative, and then calculate the cut-off value by multiplying by a factor of 0.5.

$$\bar{A}_{neg.} \times 0.5 = \text{cut off}$$

The retest range is defined as:

Cut off ± 10 %

Based on the criteria of the test, the samples are classed as follows:

Test result:

1. A_{sample} > cut off + 10 % = negative
2. A_{sample} < cut off – 10 % = positive
3. cut off – 10 % ≤ A_{sample} ≤ cut off + 10 % = equivocal

Samples which in the initial test yield absorbance readings in a range of ± 10 % of the cut-off (retest range) must be considered provisionally equivocal. To clarify the result, the sample must be retested, but this time in duplicate.

If the retest mean value of the double determination is less than the cut-off -10% or greater than the cut-off +10%, the initial equivocal result can be ignored and the sample considered negative or positive as appropriate.

If after the retest it is still not possible to class the sample as positive or negative, then the test result is defined as ”equivocal”.

Quantitative Test:

For the quantitative evaluation, calculate the mean absorbance values from the double determinations of the standard series 10, 20, 40 and 80 IU/L.

The Anti-HAV concentrations for the sample are read from this standard curve.

If the sample was diluted, then the concentration read from the standard curve must be multiplied by the dilution factor.

Limitations of the Procedure

1. Do not used patient samples containing sodium azide!
2. Samples with microbial contamination should not be used.
3. Anticoagulants such as heparin, EDTA and citrate do not affect the test results.
4. Lipemic and hemolytic samples, samples containing rheumatoid factors or ANAs, and heat-treated samples (1 hour, 56 °C) do not affect the test.
5. Buffer/Substrate TMB, Working Chromogen Solution and Stopping Solution POD must not be allowed to come into contact with heavy metal ions or oxidizing substances (do not use pipettes with metal parts which are in direct contact with the liquid). The substrate reaction step must not be performed in the vicinity of disinfectants containing hypochlorite.
6. If the Working Chromogen Solution has spontaneously developed a blue color before transferal into the test plate, this indicates that the solution is contaminated; a fresh solution must be prepared in a clean vessel.

   Skin contact with the aforementioned solutions is to be avoided.
7. The test plate should be protected from vibration during the incubation phase (e.g. placed on a secured flotation device or in a non-circulating water bath); the wells of the plate must be in contact with the thermostated water.

   If preservatives are used to prevent microbial contamination of the water, care must be taken that neither the surface of the test plate nor the wells come into contact with these solutions since such contamination can lead to unspecific reactions.
8. The control sera were produced using native human sera. Therefore turbidity may occur but does not impair the test result.

Specific Performance Characteristics

Sensitivity and Specificity

The results of the study on sensitivity and specificity are summarized in Tables 2 + 3 (see Appendix).

In establishing the sensitivity of the test, a total of 878 anti-HAV positive samples were investigated and the sensitivity was found to range from 98.5 to 100% (initial testing) and 99.0 to 100% (retest result). The reactivity of the test with seroconversion samples was investigated using 12 seroconversion panels. The results showed that, as regards detection of seroconversion, Enzygnost® Anti-HAV has a sensitivity equivalent to that of a comparable test.

The analytical sensitivity of the test was found to be ≤ 20 IU/L using the WHO International Standard.

Nevertheless, the possibility cannot be ruled out that isolated samples may escape detection when the test is used on a large scale. In establishing the specificity of the test, a total of 586 anti-HAV negative blood samples were investigated and the specificity was found to range from 96.6 to 100% (initial testing) and 98.3 to 100% (retest result). Deviations from these values may occur due to differences in sample population, test procedure, etc.

Current knowledge indicates that a positive anti-HAV test result does not provide certainty of hepatitis A infection or of current immunity, just as a negative test result does not reliably exclude the presence of hepatitis A infection or current immunity.

Reproducibility

The results for intra-assay and inter-assay reproducibility are summarized in Table 4 (See Appendix). This data is based on example calculations. Deviations from these values may occur, of course, due to differences in test procedure, etc.

Enzygnost and BEP are registered trademarks of Dade Behring Marburg GmbH in the USA, Germany and other countries.

Dade Behring Marburg GmbH
Emil-von-Behring-Str. 76
D-35041 Marburg
www.dadebehring.com

USA Distributor: Dade Behring Inc.
Newark, DE 19714 U.S.A.

Tab. 1 Storage and Stability

Enzygnost® Anti-HAV

Material/Reagent	State	Storage	Stability*
Enzygnost® Anti-HAV (Test plate / remaining strips)	once opened	+2 to +8 °C in the bag with the desiccant	6 weeks
Anti-HAV/POD Conjugate	once opened	+2 to +8 °C	4 weeks
Conjugate Buffer	once opened	+2 to +8 °C	4 weeks
Conjugate diluted ready-to-use	1 + 40	+2 to +8 °C +18 to +25 °C	4 weeks 1 week
HAV Antigen	once opened	+2 to +8 °C	4 weeks
Anti-HAV Standard Serum 80 Anti-HAV Control Serum, negative	once opened	+2 to +8 °C < -20 °C	4 weeks 3 months
Anti-HAV Standard Dilution (40, 20, 10, IU/L)	after addition of recently opened Anti-HAV Standard Serum 80	+2 to +8 °C	4 weeks
Chromogen TMB	once opened	+2 to +8 °C	expiry date
Buffer/Substrate TMB	once opened	+2 to +8 °C	expiry date
Working Chromogen Solution	1 + 10	+2 to +8 °C +18 to +25 °C sealed container, protected from light	5 days 8 hours
Washing Solution POD (concentrate)	once opened 1 : 20 1 : 20	+2 to +8 °C +2 to +8 °C +18 to +25 °C	expiry date 1 week 1 day
Stopping Solution POD	once opened	+2 to +8 °C	expiry date

* in no case past the expiration date!

Tab. 2 Sensitivity

The sensitivity studies, performed at two independent centers (K, M), yielded the following data:

Sample population	Number of samples	initial reactive	retest reactive
(M) Anti-HAV positive	30	30	30
Anti-HAV positive (Plasmas)	30	30	30
Anti-HAV/IgG positive	157	157	157
Anti-HAV/IgM positive	84	84	84
Seroconversions	12	Sensitivity corresponds to the sensitivity of a comparable test	
(K) Anti-HAV positive	204	204	204
Anti-HAV positive	205	202	203
Anti-HAV positive	168	166	167

Tab. 3 Specificity

The specificity studies, performed at two independent centers (K, M), yielded the following data:

Sample population	Number of samples	initial reactive	retest reactive
(M) normal negative sera	50	0	0
normal negative plasma samples	50	0	0
(K) normal negative sera	176	6	3
normal negative sera	310	9	5

Tab. 4 Reproducibility

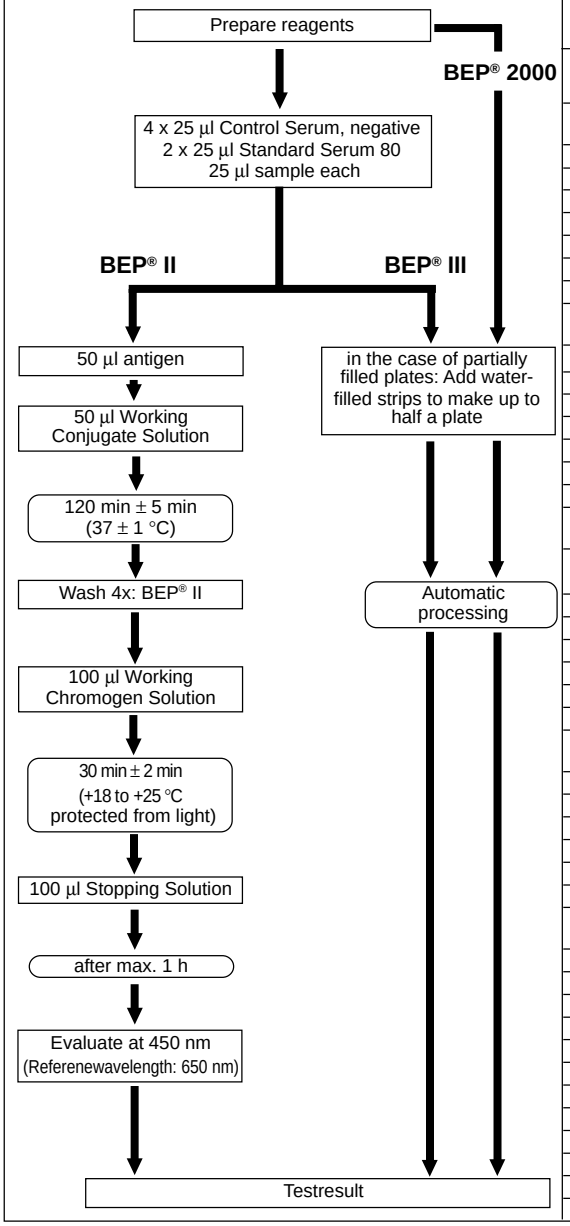
In the studies on reproducibility, the samples were tested on 5 days in 8-fold determinations on each day. The calculation of the coefficients of variation (CV) was performed according to the variance component model.

Sample	Mean A value (A)	% CV	
		Intra-assay	Inter-assay
F1	1.203	3.6	7.8
F2	0.607	5.0	9.2
F3	0.331	9.4	7.8
F4	0.115	8.3	16.6

Tab. 5 Test procedure and programming

Enzygnost® Anti-HAV

Test procedure (BEP® II, BEP® III, BEP® 2000)


Prepare reagents
BEP® 2000
4 x 25 µl Control Serum, negative
2 x 25 µl Standard Serum 80
25 µl sample each
BEP® II
BEP® III
50 µl antigen
50 µl Working Conjugate Solution
120 min ± 5 min (37 ± 1 °C)
Wash 4x: BEP® II
100 µl Working Chromogen Solution
30 min ± 2 min (+18 to +25 °C protected from light)
100 µl Stopping Solution
after max. 1 h
Evaluate at 450 nm (Referenewavelength: 650 nm)
in the case of partially filled plates: Add water-filled strips to make up to half a plate
Automatic processing
Testresult

Menu programming for the BEP® II

MENU NO	
OPERATE 1	YES
DISPENSE ANTIGEN	
WASHINGS	0
ASPIRATE	NO
SOAKTIME	0
DISP VOL	50
CHANNEL NO	3
PHOT	NO
OPERATE 2	YES
DISPENSE CONJUGATE	
WASHINGS	0
ASPIRATE	NO
SOAKTIME	0
DISP VOL	50
CHANNEL NO	2
PHOT	NO
OPERATE 3	YES
WASH AND DISPENSE CHROMOGEN	
WASHINGS	4
ASPIRATE	NO
SOAKTIME	0
DISP VOL	100
CHANNEL NO	4
PHOT	NO
OPERATE 4	YES
DISPENSE STOPPING SOLUTION	
WASHINGS	0
ASPIRATE	NO
SOAKTIME	0
DISP VOL	100
CHANNEL NO	5
PHOT	YES
MEAS WL	450
REF WL	650
BLK COR	NO
EVAL MODE	4
GEN CUT	NO
NEG CONT	4
MAX NEG	-
MIN NEG	0.700
FACT NEG	0.5
MAX POS	0.300
THRESH	-
CUT OFF	-

Enzygnost® Anti-HAV

Anwendungsbereich

Enzymimmunoassay zum Nachweis von Antikörpern gegen Hepatitis A-Virus-Antigen in Serum und Plasma. Die Abarbeitung des Enzymimmunoassays erfolgt mit den ELISA Prozessoren BEP® II, BEP® III und BEP® 2000. Der Test wurde entwickelt für die Untersuchung von Einzelproben, nicht von gepoolten oder verdünnten Proben. Das Produkt darf nur für *in vitro* diagnostische Zwecke angewendet werden.

Diagnostische Bedeutung

Bei Erkrankungsbeginn einer Hepatitis A (1, 2, 3, 4) ist Anti-HAV immer und meist bereits in hoher Aktivität nachweisbar. Ein negatives Ergebnis bei einem Patienten schließt deshalb die Hepatitis A-Ätiologie der Erkrankung aus. Da Anti-HAV nach einer Infektion zeitlebens nachweisbar bleibt, kann mit dessen Nachweis eine bestehende Immunität gesichert werden, ein wesentliches Entscheidungskriterium bei der Frage nach aktiver Immunisierung durch Impfung oder Einsatz von Immunglobulinen zur Postexpositionsprophylaxe bei Risikokontakten.

Enzygnost® Anti-HAV ermöglicht bei quantitativer Auswertung anhand des Anti-HAV-Standardserums (Eichkurve) eine quantitative Bestimmung des HAV-Antikörpergehalts und Deklaration in IU/l bezogen auf den internationalen Standard der WHO.

Prinzip der Methode

Enzygnost® Anti-HAV ist ein Enzymimmunoassay nach dem kompetitiven Testprinzip.

Die in der Untersuchungsprobe enthaltenen spezifischen Antikörper und die POD-konjugierten monoklonalen Antikörper gegen HAV konkurrieren um die Bindungsstellen des HAV-Antigens, das ebenfalls als Reagenz-Komponente dem Einschritt-Assay zugesetzt wird. In Abhängigkeit von der Konzentration des spezifischen Antikörpers in der Probe kann mehr oder weniger Konjugat an das Antigen gebunden werden.

Der entstandene Immunkomplex bindet sich an die an der Oberfläche der Mikrotitrationsplatte fixierten HAV-spezifischen Antikörper.

Nach Entfernung der ungebundenen Bestandteile durch Waschen wird die gebundene Enzymaktivität des Konjugates bestimmt. Die enzymatische Umsetzung von Substrat und Chromogen (blaue Farbreaktion) wird durch Zusatz von Stopplösung POD unterbrochen (gelbe Farbreaktion). Die Farbintensität ist der in der Probe vorhandenen Antikörperkonzentration umgekehrt proportional.

Reagenzien

Inhalt der Handelspackung

Enzygnost® Anti-HAV	*1 x 96*
Enzygnost® Anti-HAV Testplatte	1 Stück
Anti-HAV/POD-Konjugat	1 x 0,4 ml
Konjugat-Puffer (Anti-HAV)	2 x 6 ml
HAV-Antigen	2 x 6 ml
Anti-HAV-Standard-Serum 80	1 x 0,5 ml
Anti-HAV-Kontroll-Serum, negativ	1 x 6 ml
Waschlösung POD (Konzentrat)	1 x 100 ml
Puffer/Substrat TMB	1 x 30 ml
Chromogen TMB	1 x 3 ml
Stopplösung POD	1 x 100 ml
Leerflasche für Chromogen-Gebrauchslösung	1 Stück
Abklebefolien	6 Stück
PE-Beutel zur Aufbewahrung nicht benötigter Restriegel	1 Stück
Barcode-Wertetabelle	1 Stück
Packungsbeilage	1 Stück

Zusammensetzung

Enzygnost® Anti-HAV (Testplatte)

Mit humanen Antikörpern gegen Hepatitis A-Virus-Antigen beschichtete Mikrotitrationsplatte.

Anti-HAV/POD-Konjugat

Anti-HAV monoclonal (Maus), Peroxidase(POD)-konjugiert, in Tris-Pufferlösung (0,05 mol/l)

Gebrauchsverdünnung: 1 + 40 in Konjugat-Puffer (Anti-HAV)

Konservierungsmittel: Phenol (max. 1 g/l)

Konjugat-Puffer (Anti-HAV) als Verdünnungsmedium für Anti-HAV/POD-Konjugat:

enthält Glycerin (100 g/l), Tween 20 (20 g/l), Natriumchlorid (8,8 g/l), EDTA (1,9 g/l), Albumin vom Rind (1 g/l), Polygeline und Phosphat (50 mmol/l)

Konservierungsmittel: Phenol (max. 1 g/l)

HAV-Antigen:

Hepatitis A-Virus-Antigen aus humanen Fibroblasten, inaktiviert

Konservierungsmittel: Phenol (max. 1 g/l)

Anti-HAV-Standard-Serum 80:

Humanserum mit Antikörpern gegen HAV (nominell 80 ± 20 IU/l), bezogen auf das WHO-Referenz-Präparat

Extinktionsrichtwert ≤ 0,3 E

Konservierungsmittel: Phenol (max. 1 g/l)

Anti-HAV-Kontroll-Serum, negativ:

Humanserum ohne Antikörper gegen HAV

Extinktionsrichtwert ≥ 0,7

Konservierungsmittel: Phenol (max. 1 g/l)

Waschlösung POD (Konzentrat):

Tween-haltige (18 g/l) Phosphat-Pufferlösung (90 mmol/l)

Konservierungsmittel: Phenol (max. 1 g/l)

Puffer/Substrat TMB:

Wasserstoffperoxid (ca. 0,1 g/l) in Acetat-Pufferlösung (25 mmol/l)

Konservierungsmittel: n-Butanol (max. 1 %)

Chromogen TMB:

Tetramethylbenzidin-dihydrochlorid (5 g/l)

Stopplösung POD: 0,5 N Schwefelsäure

Die Reagenzien (ausgenommen Waschlösung POD, Stopplösung POD und die aus den chargengebundenen Reagenzien Chromogen TMB und Puffer/Substrat TMB hergestellte Chromogen-Gebrauchslösung) sind nur chargengebunden zu verwenden, d.h. nur in der Kombination der einzelnen 6-ziffrigen Chargen-Bezeichnungen (Ch.-B.), die auf der Packung aufgedruckt bzw. der separat beigepackten Barcodewerte-Tabelle zu entnehmen sind.

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

1. Nur zur *in vitro* diagnostischen Anwendung
2. Jede individuelle Blutspende, die zur Herstellung von Standard- und Kontroll-Sera vorgesehen war, wurde auf HBsAg, auf Anti-HCV, auf Anti-HIV1 und auf Anti-HIV2 untersucht. Für die Herstellung wurden nur Spenden mit negativem Befund verwendet.

   Unabhängig davon sollten alle aus menschlichem Blut gewonnenen Materialien wegen nie auszuschließender Gefährdung durch Krankheitserreger mit angemessener Sorgfalt unter Einhaltung der bei Biogefährdung empfohlenen Sicherheitsmaßnahmen gehandhabt werden (5).
3. Das aus humanen Fibroblasten isolierte HAV-Antigen wird einem anerkannten Virusinaktivierungsverfahren (Umsetzung mit β-Propiolacton) ausgesetzt. Zur Sicherheit sollte das HAV-Antigen trotzdem mit entsprechender Vorsicht gehandhabt werden (5).
4. Das Tragen von Untersuchungshandschuhen während der gesamten Testdurchführung wird angeraten.
5. Zur Desinfektion fester Materialien empfiehlt sich eine Autoklavierung von mindestens 1 Stunde bei +121 °C. Alle abgesaugten Lösungen sind in zwei hintereinandergeschalteten Vorlagen zu sammeln. Die Vorlagen sollten ein Desinfektionsmittel enthalten, das geeignet ist, human-pathogene Viren zu inaktivieren; die vom Hersteller angegebenen Konzentrationen und Einwirkungszeiten müssen beachtet werden.

Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien und Untersuchungsproben vor Testbeginn auf +18 bis +25 °C erwärmen. Dabei die Testplatte **nicht** dem Behältnis entnehmen.

Je Testplatte **20 ml Waschlösung POD** (Konzentrat) mit destilliertem oder entionisiertem Wasser auf **400 ml** verdünnen.

Chromogen-Gebrauchslösung: Je Testplatte **1 ml Chromogen TMB** mit **10 ml Puffer/Substrat TMB** in der mitgelieferten Leerflasche verdünnen und verschlossen unter Lichtschutz aufbewahren. Flasche nach Gebrauch sorgfältig mit destilliertem Wasser spülen.

Wegen technisch bedingter Überfüllung ist das Zusammengießen der Flascheninhalte von Chromogen TMB und Puffer/Substrat TMB nicht zulässig.

Für die **quantitative Testdurchführung** müssen von dem Anti-HAV-Standard-Serum 80 folgende Verdünnungen mit dem **Anti-HAV-Kontroll-Serum, negativ** hergestellt werden:

40 IU/l: Verdünnung 1:2 (z. B. 100 µl Anti-HAV-Standard-Serum 80 + 100 µl Anti-HAV-Kontroll- Serum, negativ).

20 IU/l: Verdünnung 1:4 (z. B. 100 µl des 40 IU/l Standards + 100 µl Anti-HAV-Kontroll-Serum, negativ).

10 IU/l: Verdünnung 1:8 (z. B. 100 µl des 20 IU/l Standards + 100 µl Anti-HAV-Kontroll-Serum, negativ.

Bei zu erwartenden **Anti-HAV-Konzentrationen von ≥ 60 IU/l** müssen die **Seren oder Plasmen** wie folgt verdünnt werden:

Bis 600 IU/l Verdünnung 1:11 (z. B. 10 µl Probe + 100 µl Anti-HAV-Kontroll-Serum, negativ).

Bis 6 000 IU/l Verdünnung 1:101 (z. B. 10 µl Probe + 1 000 µl Anti-HAV-Kontroll-Serum, negativ).

Bis 60 000 IU/l Verdünnung 1:1111 (z. B. 10 µl Probe + 1 000 µl Anti-HAV-Kontroll-Serum, negativ; daraus 10 µl + 100 µl Anti-HAV-Kontroll-Serum, negativ).

Alle notwendigen Verdünnungsschritte sind nur mit dem zugehörigen Anti-HAV-Kontroll-Serum, negativ durchzuführen.

Konjugat-Gebrauchslösung: Dem Anti-HAV/POD-Konjugat ist die benötigte Menge zu entnehmen und mit dem Konjugat-Puffer (Anti-HAV) 1 + 40 zu verdünnen. [Je Testplatte 150 µl Anti-HAV/POD-Konjugat zu einer Originalabfüllung (6 ml) Konjugat-Puffer (Anti-HAV) zugeben.]

Haltbarkeit und Lagerungsbedingungen

Ungeöffnet sind alle Bestandteile der Kombinationspackung Enzygnost® Anti-HAV bei einer Lagertemperatur von +2 bis +8 °C bis zu den auf den Etiketten angegebenen Daten verwendbar.

Die Haltbarkeit und Lagerbedingungen der geöffneten bzw. gebrauchsverdünnten Reagenzien sind der Tabelle 1 im Anhang zu entnehmen.

Erforderliche Geräte

BEP® II:	Zur automatischen Durchführung der Reagenzien-Dosierung und der Waschschritte
BEP® III:	Zur automatischen Testabarbeitung nach der Probendispensierung sowie Auswertung
BEP® 2000:	Zur vollautomatischen Testabarbeitung sowie Auswertung
Pipetten:	Kolbenhubpipetten 25, 50, 100 und 1000 µl
Inkubator:	Bedecktes Wasserbad (+37 ± 1 °C)

Testdurchführung

Testdurchführung mit BEP® II

1. **Ansatzschema:**

   Benötigte Anzahl der Auftragsstellen feststellen (Anzahl der zu untersuchenden Proben plus 6 Vertiefungen für Kontrollen). Für die Testdurchführung nicht benötigte Riegel dem Halterahmen entnehmen und für die spätere Verwendung lagern (siehe Tabelle 1).

   Bei quantitativer Testauswertung wird eine Standardkurve erstellt (siehe vorbereitende Arbeiten), deren einzelne Konzentrationen jeweils als Doppelbestimmung eingesetzt werden (in diesem Fall Anzahl der zu untersuchenden Proben plus 12 Vertiefungen für Kontrollen und Standardreihe).

2 **Probendosierung**

   Qualitativer Test: In 4 Vertiefungen (A1 bis D1) je 25 µl Anti-HAV-Kontroll-Serum, negativ, in 2 Vertiefungen (E1 und F1) je 25 µl Anti-HAV-Standard-Serum 80 und in die folgenden Vertiefungen je 25 µl Probe pipettieren.

   Alternativ zu oben aufgeführtem Pipettierschema ist es auch erlaubt, Anti-HAV-Standard-Serum 80 einmal zu Beginn und einmal am Ende der Testreihe aufzutragen.

   Pipettierschema: In 4 Vertiefungen je 25 µl Anti-HAV-Kontroll-Serum, negativ, in eine Vertiefung 25 µl Anti-HAV-Standard-Serum 80, in die folgenden Vertiefungen je 25 µl Probe und am Ende der Serie bzw. Testplatte noch einmal 25 µl Anti-HAV-Standard-Serum 80 dosieren.

Quantitativer Test: In 4 Vertiefungen (A1, A2, B1 und B2) je 25 µl Anti-HAV-Kontroll-Serum, negativ und anschließend in jeweils 2 Vertiefungen je 25 µl des Anti-HAV-Standard-Serums entsprechend 80 (C1 und C2), 40 (D1 und D2), 20 (E1 und E2) und 10 (F1 und F2) IU/l pipettieren. In die folgenden Vertiefungen je 25 µl Probe (evtl. nach Bedarf vorverdünnt) dosieren.

Nach Beenden der Proben-Dosierung die Antigen-Zugabe unmittelbar anschließen.

3. **Antigen-Dosierung**

   In jede Vertiefung zu der vorgelegten Probe je 50 µl Antigen-Lösung zudosieren und die Konjugat-Dosierung unmittelbar anschließen.

4. **Konjugat-Dosierung**

   Jeweils 50 µl Konjugat-Gebrauchslösung zu Probe und Antigen zudosieren (siehe Hinweis), die Testplatte mit Folie abkleben und sofort in den Inkubator stellen.

   Hinweis:

   Bei manueller Durchführung muss zur Vermeidung von verfälschten Ergebnissen die Konjugat-Dosierung so vorgenommen werden, dass die Pipettenspitze den Rand der Kavität nicht berührt und nicht in die Probenflüssigkeit eintaucht.

5. **Inkubation**

   2 Stunden ± 5 Minuten bei +37 ± 1 °C inkubieren, Waschvorgang unmittelbar anschließen.

6. **Waschen**

   Folie abziehen; alle Vertiefungen aussaugen und mit je ca. 0,3 ml Waschlösung 4mal waschen. Nach Abschluß der Waschschritte die nächste Reagenzdosierung sofort anschließen, um ein Eintrocknen zu vermeiden.

7. **Substrat-Dosierung**

   In jede Vertiefung 100 µl Chromogen-Gebrauchslösung einfüllen, Platte mit neuer Folie abkleben.

8. **Substrat-Inkubation**

   30 ± 2 Minuten bei +18 bis +25 °C lichtgeschützt inkubieren.

9. **Stoppreaktion**

   Folie entfernen und je Vertiefung 100 µl Stopplösung POD zugeben, dabei gleichen Zeittakt wie bei Punkt 7 einhalten.

10. **Messung**

    Innerhalb einer Stunde bei 450 nm photometrieren. Als Wellenlänge der Referenzmessung wird 650 nm (ggf. zwischen 615 und 690 nm) empfohlen.

Testdurchführung mit BEP® III

Bei der Abarbeitung mit BEP® III müssen die Testplatten bis zur Probendosierung (Punkt 1 bis 2 der "Testdurchführung BEP® II") vorbereitet werden. Alle folgenden Abarbeitungsschritte erfolgen vollautomatisch im Gerät (siehe BEP® III-Bedienungsanleitung). Platten nicht mit Folie abkleben. Nach Beenden der Proben-Dosierung die Platte unmittelbar in den BEP® III eingeben.

Die in der BEP® III-Software eingestellten Inkubationszeiten können auf Grund der technischen Rahmenbedingungen (Gerätetaktung) von denen der BEP® II Prozessierung abweichen, sind jedoch in der Kombination BEP® III/Enzygnost® validiert worden.

Testdurchführung mit BEP® 2000

Die Probendosierung und die anschließende Testabarbeitung erfolgen vollautomatisch im Gerät (siehe BEP® 2000-Bedienungsanleitung).

Testvalidierung

Die Einzelwerte der Extinktionen für die Kontroll-Sera werden zur Berechnung der Mittelwerte eingesetzt, wenn

$$E_{neg.} \geq 0{,}700$$

$$-0{,}010 \leq E_{ST80} \leq 0{,}300$$

Von den Extinktionswerten des Anti-HAV-Kontroll-Serums, negativ kann ein außerhalb der Spezifikation liegender Wert vernachlässigt werden.

Die Extinktionswerte des Standard-Serums 80 müssen beide die Spezifikationen erfüllen. Werden diese Bedingungen nicht erfüllt, ist der Test zu wiederholen.

Testauswertung

Die Auswertungen erfolgen mit dem BEP® 2000 oder BEP® III automatisch. Bitte dazu die Bedienungsanleitungen heranziehen. Die nachfolgenden Kapitel sind bei Auswertung ohne Softwareunterstützung zu beachten.

Qualitativer Test

Aus den Extinktionswerten des Anti-HAV-Kontroll-Serums, negativ wird der Mittelwert gebildet. Zur Grenzwertberechnung wird der Extinktionsmittelwert des Anti-HAV-Kontroll-Serums, negativ mit dem Faktor 0,5 multipliziert.

$$\bar{E}_{neg.} \times 0{,}5 = \text{Grenzwert (cut off)}$$

Als grenzwertiger Bereich wird definiert:

$$\text{Grenzwert} \pm 10\ \%$$

Nach den Kriterien des Tests werden die Untersuchungsproben wie folgt klassifiziert.

Testergebnis:

1. $E_{Probe} > \text{cut off} + 10\ \%$ = negativ
2. $E_{Probe} < \text{cut off} - 10\ \%$ = positiv
3. $\text{cut off} - 10\ \% \leq E_{Probe} \leq \text{cut off} + 10\ \%$ = grenzwertig

Proben, die in der initialen Testung mit Extinktionswerten in einem Bereich von ± 10 % des Grenzwertes (grenzwertiger Bereich) reagieren, müssen als vorläufig grenzwertig betrachtet werden. Zur Abklärung des Ergebnisses muss die Probe erneut, diesmal jedoch in Doppelbestimmung, getestet werden.

Ist in der Wiederholungstestung der Mittelwert der Doppelbestimmung kleiner als der Grenzwert -10 % bzw. größer als der Grenzwert +10 %, so kann das initial grenzwertige Ergebnis vernachlässigt werden und die Probe als positiv bzw. negativ betrachtet werden.

Ist auch danach keine Zuordnung der Proben als positiv oder negativ möglich, lautet das Testergebnis "grenzwertig".

Quantitativer Test:

Zur quantitativen Auswertung werden die Extinktionsmittelwerte aus den Doppelbestimmungen der Standardreihe 10, 20, 40 und 80 IU/l gebildet.

Anhand dieser Standardkurve wird die Anti-HAV-Konzentration der Probe abgelesen.

Wurde die Probe verdünnt, so muss die anhand der Standardkurve abgelesene Konzentration mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

Einschränkungen der Testdurchführung

1. Natriumazid-haltiges Patientenmaterial darf nicht verwendet werden!
2. Mikrobiell kontaminierte Proben sollten nicht verwendet werden.
3. Antikoagulanzien wie Heparin, EDTA und Citrat beeinflussen das Testergebnis nicht.
4. Lipämische, hämolytische ,Rheumafaktor-haltige und ANA-haltige-Proben sowie hitzeinaktivierte Proben(1 h, 56 °C) führen zu keiner Testbeeinträchtigung.
5. Puffer/Substrat TMB, Chromogen-Gebrauchslösung und Stopplösung POD dürfen nicht in Kontakt mit Schwermetallionen oder oxidierenden Substanzen kommen (keine Pipetten mit flüssigkeitsführenden Metallteilen verwenden). Die Substratreaktion nicht in der Nähe von Hypochlorithaltigen Desinfektionsmitteln durchführen.
6. Eine spontane Blaufärbung der Chromogen-Gebrauchslösung vor der Übertragung in die Testplatte deutet auf Kontamination hin; eine frische Lösung ist in einem sauberen Gefäß anzusetzen. Hautkontakt mit den vorgenannten Lösungen ist zu vermeiden.
7. Die Testplatte soll während der Inkubation ruhig liegen (z. B. auf fixierter Schwimmhilfe oder im nicht zirkulierenden Wasserbad); die Kavitäten sind dabei in Kontakt mit dem temperierten Wasser. Werden Konservierungsmittel zur Verhinderung der Verkeimung des Wassers verwendet, so ist sorgfältig darauf zu achten, dass weder die Testplattenoberfläche noch die Näpfchen mit diesen Lösungen in Kontakt kommen, da derartige Kontaminationen unspezifische Reaktionen hervorrufen können.
8. Die Kontrollsera sind unter Verwendung nativer Humansera hergestellt. Daher können Trübungen auftreten, die das Testergebnis jedoch nicht beeinflussen.

Leistungsmerkmale des Tests

Sensitivität und Spezifität

Die Ergebnisse zur Prüfung der Sensitivität und Spezifität sind in den Tabellen 2 + 3 (im Anhang) zusammengefaßt.

Bei der Ermittlung der Sensitivität wurden insgesamt 878 Anti-HAV-positive Proben untersucht und eine Sensitivität von 98,5 bis 100 % (initiale Testung) bzw. 99,0 - 100 % (Retestung) ermittelt. Die Reaktivität des Tests bei Serokonversionsproben wurde anhand von 12 Serokonversionspanels untersucht. Dabei zeigte sich, dass Enzygnost® Anti-HAV eine Sensitivität bezüglich der Erkennung von Serokonversionen aufweist, die der Empfindlichkeit eines vergleichbaren Tests entspricht.

Die analytische Sensitivität wurde am internationalen Standard der WHO mit ≤ 20 IU/l ermittelt.

Unabhängig davon kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich bei breiter Anwendung des Tests einzelne Proben dem Nachweis entziehen können.

Bei der Ermittlung der Spezifität wurden insgesamt 586 Anti-HAV-negative Blutproben untersucht und eine Spezifität von 96,6 bis 100 % (initiale Testung) bzw. 98,3 bis 100 % (Retestung) ermittelt. Bedingt durch das Untersuchungskollektiv, die Testdurchführung u.a. sind abweichende Werte möglich.

Nach derzeitigem Kenntnisstand kann aus einem positiven Ergebnis der Anti-HAV-Testung nicht mit Sicherheit abgeleitet werden, dass eine Hepatitis A-Infektion bzw. eine bestehende Immunität vorliegt, wie auch ein negatives Testergebnis das Vorliegen einer Hepatitis A-Infektion oder einer bestehenden Immunität nicht sicher ausschließt.

Reproduzierbarkeit

Die Ergebnisse zur Intra/Inter-assay Reproduzierbarkeit sind in der Tabelle 4 (im Anhang) zusammengefasst. Es handelt sich hierbei um beispielhaft ermittelte Daten. Abhängig von der Testdurchführung u. a. sind durchaus abweichende Werte möglich.

Enzygnost und BEP sind eingetragene Marken der Dade Behring Marburg GmbH in den USA, Deutschland und anderen Ländern.

Dade Behring Marburg GmbH
Emil-von-Behring-Str. 76
D-35041 Marburg
www.dadebehring.com

CE

Tab. 1 Haltbarkeit und Lagerungsbedingungen

Enzygnost® Anti-HAV

Material/Reagenz	Zustand	Lagerung	Stabilität*
Enzygnost® Anti-HAV (Testplatte / restliche Riegel)	nach Öffnen	+2 bis +8 °C im Beutel mit Trockenkapseln	6 Wochen
Anti-HAV/POD-Konjugat	nach Öffnen	+2 bis +8 °C	4 Wochen
Konjugat-Puffer	nach Öffnen	+2 bis +8 °C	4 Wochen
gebrauchsfertig verdünntes Konjugat	1 + 40	+2 bis +8 °C +18 bis +25 °C	4 Wochen 1 Woche
HAV-Antigen	nach Öffnen	+2 bis +8 °C	4 Wochen
Anti-HAV-Standard-Serum 80 Anti-HAV-Kontroll-Serum, negativ	nach Öffnen	+2 bis +8 °C < -20 °C	4 Wochen 3 Monate
Anti-HAV-Standard-Verdünnung (40, 20, 10, IU/l)	nach Ansatz mit frisch geöffnetem Anti-HAV-Standard-Serum 80	+2 bis +8°C	4 Wochen
Chromogen TMB	nach Öffnen	+2 bis +8 °C	bis Verfalldatum
Puffer/Substrat TMB	nach Öffnen	+2 bis +8 °C	bis Verfalldatum
Chromogen-Gebrauchslösung	1 + 10	+2 bis +8 °C +18 bis +25 °C geschlossenes Gefäß, lichtgeschützt	5 Tage 8 Stunden
Waschlösung POD (Konzentrat)	nach Öffnen 1 : 20 1 : 20	+2 bis +8 °C +2 bis +8 °C +18 bis +25 °C	bis Verfalldatum 1 Woche 1 Tag
Stopplösung POD	nach Öffnen	+2 bis +8 °C	bis Verfalldatum

* In keinem Fall länger als bis zum Verfalldatum!

Tab. 2 Sensitivität

Bei den Untersuchungen zur Sensitivität wurden an zwei unabhängigen Zentren (K, M) folgende Daten ermittelt:

Probenkollektiv	Probenanzahl	initial reaktiv	retest reaktiv
(M) Anti-HAV pos.	30	30	30
Anti-HAV pos. (Plasmen)	30	30	30
Anti-HAV/IgG pos.	157	157	157
Anti-HAV/IgM pos.	84	84	84
Serokonversionen	12	Sensitivität entspricht der Empfindlichkeit eines vergleichbaren Testes	
(K) Anti-HAV pos.	204	204	204
Anti-HAV pos.	205	202	203
Anti-HAV pos.	168	166	167

Tab. 3 Spezifität

Bei den Untersuchungen zur Spezifität wurden an zwei unabhängigen Zentren (K, M) folgende Daten ermittelt:

Probenkollektiv	Probenanzahl	initial reaktiv	retest reaktiv
(M) normal negative Seren	50	0	0
normal negative Plasmaproben	50	0	0
(K) normal negative Seren	176	6	3
normal negative Seren	310	9	5

Tab. 4 Reproduzierbarkeit

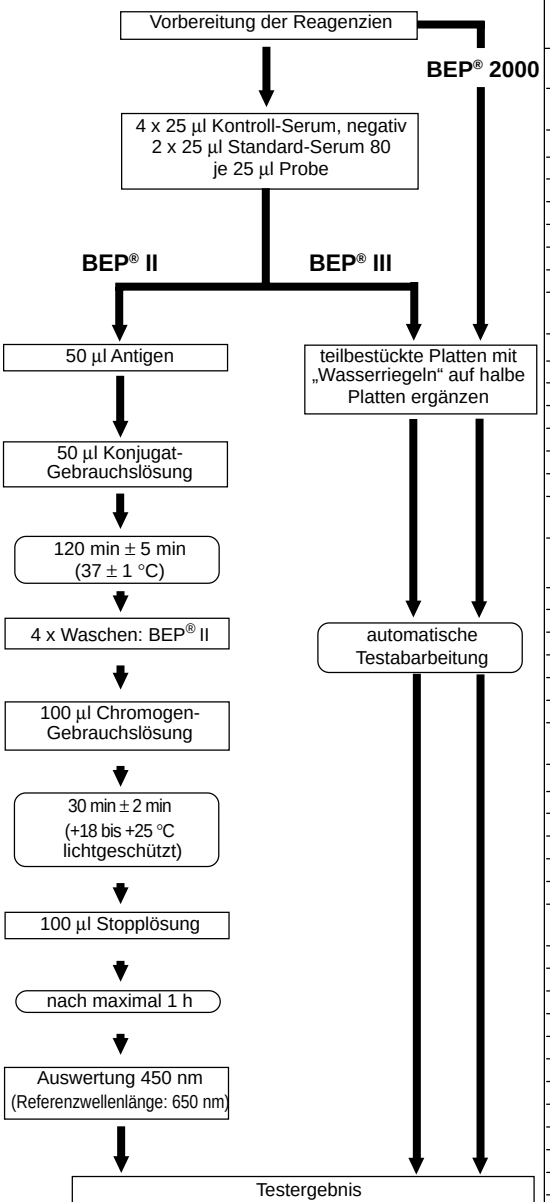
Bei den Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit wurden die Proben an 5 Tagen in jeweils 8fach-Bestimmung getestet. Die Berechnung der Variationskoeffizienten (VK) erfolgte nach dem Varianzkomponentenmodell.

Probe	Extinktionsmittelwert (E)	% VK	
		Intra-Assay	Inter-Assay
F1	1,203	3,6	7,8
F2	0,607	5,0	9,2
F3	0,331	9,4	7,8
F4	0,115	8,3	16,6

Tab. 5 Testdurchführung und -programmierung

Enzygnost® Anti-HAV

Testdurchführung (BEP® II, BEP® III, BEP® 2000)


Vorbereitung der Reagenzien
BEP® 2000
4 x 25 µl Kontroll-Serum, negativ
2 x 25 µl Standard-Serum 80
je 25 µl Probe
BEP® II
BEP® III
50 µl Antigen
teilbestückte Platten mit „Wasserriegeln“ auf halbe Platten ergänzen
50 µl Konjugat-Gebrauchslösung
120 min ± 5 min (37 ± 1 °C)
4 x Waschen: BEP® II
automatische Testabarbeitung
100 µl Chromogen-Gebrauchslösung
30 min ± 2 min (+18 bis +25 °C lichtgeschützt)
100 µl Stopplösung
nach maximal 1 h
Auswertung 450 nm (Referenzwellenlänge: 650 nm)
Testergebnis

Menüprogrammierung für den BEP® II

MENU NO	
OPERATE 1	YES
DOSIERUNG ANTIGEN	
WASHINGS	0
ASPIRATE	NO
SOAKTIME	0
DISP VOL	50
CHANNEL NO	3
PHOT	NO
OPERATE 2	YES
DOSIERUNG KONJUGAT	
WASHINGS	0
ASPIRATE	NO
SOAKTIME	0
DISP VOL	50
CHANNEL NO	2
PHOT	NO
OPERATE 3	YES
WASCHEN UND DOSIERUNG CHROMOGEN	
WASHINGS	4
ASPIRATE	NO
SOAKTIME	0
DISP VOL	100
CHANNEL NO	4
PHOT	NO
OPERATE 4	YES
DOSIERUNG STOPPLÖSUNG	
WASHINGS	0
ASPIRATE	NO
SOAKTIME	0
DISP VOL	100
CHANNEL NO	5
PHOT	YES
MEAS WL	450
REF WL	650
BLK COR	NO
EVAL MODE	4
GEN CUT	NO
NEG CONT	4
MAX NEG	-
MIN NEG	0.700
FACT NEG	0.5
MAX POS	0.300
THRESH	-
CUT OFF	-

Enzygnost® Anti-HAV

Domaine d'utilisation

Test immunoenzymatique pour la mise en évidence des anticorps anti-antigène du virus de l'hépatite A dans le sérum et le plasma.

La réalisation du test immunoenzymatique est effectuée à l'aide des ELISA Processeurs BEP® II, BEP® III et BEP® 2000. Le test a été mis au point pour l'analyse d'échantillons individuels, et non d'échantillons poolés ni dilués. Il ne doit être utilisé qu'à des fins de diagnostic *in vitro*.

Intérêt diagnostique

Au début d'une hépatite A (1, 2, 3, 4), on met toujours en évidence des anti-HAV, et le plus souvent à une activité déjà élevée. Un résultat négatif en anti-HAV exclut donc une étiologie à hépatite A de la maladie. Dans la mesure où, après une infection, la présence d'anti-HAV persiste pendant toute la vie, leur mise en évidence garantit l'existence d'une immunité, ce qui constitue un critère de décision important lorsqu'on se pose la question de procéder à une immunisation active par vaccination, ou à l'administration d'immunoglobulines pour une prophylaxie après un risque de contage.

Enzygnost® Anti-HAV permet, en exploitant quantitativement le Sérum standard Anti-HAV (courbe d'étalonnage), de faire un dosage quantitatif des anticorps anti-HAV et d'exprimer les résultats en UI/l en référence au standard international de l'OMS.

Principe de la méthode

Enzygnost® Anti-HAV est un test immunoenzymatique basé sur le principe de compétition. Les anticorps spécifiques présents dans l'échantillon à tester et les anticorps anti-HAV monoclonaux conjugués au POD entrent en compétition vis-à-vis des sites de fixation de l'antigène HAV, également ajouté comme réactif dans ce test en une étape. Selon la concentration d'anticorps spécifiques dans l'échantillon, plus ou moins de conjugué se fixe sur l'antigène. Les immuncomplexes ainsi obtenus se lient alors aux anticorps anti-HAV spécifiques fixés à la surface de la plaque de microtitration.

Après élimination des éléments non liés par lavage, l'activité enzymatique liée du conjugué est mesurée. La transformation enzymatique du substrat et du chromogène (réaction colorée bleue) est stoppée par l'addition de Solution d'arrêt POD (réaction colorée jaune). L'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à la concentration d'anticorps présente dans l'échantillon.

Réactifs

Conditionnement

Enzygnost® Anti-HAV	*1 x 96*
Enzygnost® Anti-HAV plaque-test	1 pièce
Conjugué Anti-HAV/POD	1 x 0,4 ml
Tampon Conjugué (Anti-HAV)	2 x 6 ml
Antigène HAV	2 x 6 ml
Sérum standard Anti-HAV 80	1 x 0,5 ml
Sérum de contrôle Anti-HAV négatif	1 x 6 ml
Solution de lavage POD (concentrée)	1 x 100 ml
Tampon/Substrat TMB	1 x 30 ml
Chromogène TMB	1 x 3 ml
Solution d'arrêt POD	1 x 100 ml
Flacon vide pour solution d'emploi du Chromogène	1 pièce
Feuilles adhésives	6 pièces
Sachets PE pour la conservation des barrettes non utilisées	1 pièce
Tableau de valeurs codes-barres	1 pièce
Fiche technique	1 pièce

Composition

Enzygnost® Anti-HAV (plaque-test)

Plaque de microtitration recouverte d'anticorps humains anti-antigène du virus de l'hépatite A.

Conjugué Anti-HAV/POD

Anti-HAV monoclonal (souris) conjugué à la peroxydase (POD), en solution tampon Tris (0,05 mol/l)

Dilution d'emploi : 1/41 en Tampon Conjugué (Anti-HAV)
Agent de conservation : phénol (max. 1 g/l)

Tampon Conjugué (Anti-HAV) comme solution de dilution pour le Conjugué Anti-HAV/POD : contient de la glycérine (100 g/l), du Tween 20 (20 g/l), du chlorure de sodium (8,8 g/l), de l'EDTA (1,9 g/l), de l'albumine bovine (1 g/l), de la polygéline et du phosphate (50 mmol/l).

Agent de conservation : phénol (max. 1 g/l)

Antigène HAV :

Antigène du virus de l'hépatite A obtenu à partir de fibroblastes humains, inactivé.
Agent de conservation : phénol (max. 1 g/l)

Sérum standard Anti-HAV 80 :

Sérum humain contenant des anticorps anti-HAV (valeur nominative de 80 ± 20 IU/l), en référence à la préparation de référence de l'OMS.

Valeur de densité optique indicative ≤ 0,3 D.O.
Agent de conservation : phénol (max. 1 g/l)

Sérum de contrôle Anti-HAV négatif :

Sérum humain exempt d'anticorps anti-HAV.
Valeur de densité optique indicative ≥ 0,7 D.O.
Agent de conservation : phénol (max. 1 g/l)

Solution de lavage POD (concentrée) :

Solution tampon phosphate (90 mmol/l) additionnée de Tween (18 g/l)
Agent de conservation : phénol (max. 1 g/l)

Tampon/Substrat TMB:

Peroxyde d'hydrogène (env. 0,1 g/l) en solution tampon acétate (25 mmol/l)
Agent de conservation : n-butanol (max. 1 %)

Chromogène TMB :

Tétraméthylbenzidine dihydrochlorure (5 g/l)

Solution d'arrêt POD : acide sulfurique 0,5 N

Les réactifs (à l'exception de la Solution de lavage POD, de la Solution d'arrêt POD et de la solution d'emploi du Chromogène obtenue à partir des lots de réactifs indiqués pour le Chromogène TMB et le Tampon/Substrat TMB) ne peuvent être utilisés que selon la combinaison des numéros de lots à 6 chiffres indiqués sur le coffret et dans le tableau des valeurs codes-barres joint.

Mises en garde et précautions d'emploi

1. Réservé à un usage de diagnostic *in vitro*.
2. Tout don de sang individuel prévu pour la préparation des Sérums standard et de contrôle a été testé vis-à-vis de l'AgHBs, de l'anticorps anti-VHC, de l'anticorps anti-VIH 1 et de l'anticorps anti-VIH 2. Seuls les dons trouvés négatifs ont été utilisés.

   Néanmoins, toutes les préparations obtenues à partir de sang humain doivent être manipulées avec les précautions nécessaires en cas de risque biologique, dans la mesure où l'on ne peut exclure totalement un risque d'infection (5).
3. L'antigène HAV isolé à partir de fibroblastes humains a été préparé selon une procédure d'inactivation virale reconnue (traitement par la β-propiolactone). Par sécurité, il est toutefois recommandé de manipuler l'antigène HAV avec toutes les précautions nécessaires (5).
4. Il est recommandé de porter des gants de protection pendant toute la réalisation du test.
5. Pour décontaminer le matériel de laboratoire infecté, l'autoclaver pendant au moins 1 heure à +121°C. Toutes les solutions aspirées doivent être récoltées dans deux récipients reliés l'un à l'autre et contenant chacun un désinfectant spécialement prévu pour inactiver les virus pathogènes pour l'Homme. Respecter les concentrations et temps d'incubation indiqués par le fabricant du désinfectant utilisé.

Préparation des réactifs

Porter tous les réactifs et échantillons à une température comprise entre +18 et +25°C avant le début du test, **sans** sortir la plaque-test de son emballage.

Pour une plaque, diluer **20 ml de Solution de lavage** (concentrée) avec le l'eau distillée ou désionisée en complétant à **400 ml**.

Solution d'emploi du Chromogène : pour une plaque, diluer **1 ml de Chromogène TMB** avec **10 ml de Tampon/Substrat** dans le flacon plastique vide joint au coffret, et conserver la solution à l'abri de la lumière. Après emploi, bien rincer le flacon avec de l'eau distillée.

Pour des raisons techniques de capacité des flacons, il n'est pas possible de verser le contenu d'un flacon de Chromogène TMB dans un flacon de Tampon/Substrat TMB, ni inversement.

Pour une **exploitation quantitative du test**, préparer les dilutions suivantes du Sérum standard Anti-HAV 80 avec le Sérum **de contrôle Anti-HAV négatif** :

40 IU/l : dilution au 1/2 (par ex. 100 µl de Sérum standard Anti-HAV 80 + 100 µl de Sérum de contrôle Anti-HAV négatif).

20 IU/l : dilution au 1/4 (par ex. 100 µl de Sérum standard à 40 UI/l + 100 µl de Sérum de contrôle Anti-HAV négatif).

10 IU/l : dilution au 1/8 (par ex. 100 µl de Sérum standard à 20 UI/l + 100 µl de Sérum de contrôle Anti-HAV négatif).

Si on s'attend à des **concentrations d'anti-HAV ≥ 60 UI/l**, diluer les **sérums ou les plasmas** aux dilutions suivantes :

Jusqu'à 600 UI/l : dilution au 1/11 (par ex. 10 µl d'échantillon + 100 µl de Sérum de contrôle Anti-HAV négatif).

Jusqu'à 6000 UI/l : dilution au 1/101 (par ex. 10 µl d'échantillon + 1000 µl de Sérum de contrôle Anti-HAV négatif).

Jusqu'à 60 000 UI/l : dilution au 1/1111 (par ex. 10 µl d'échantillon + 1000 µl de Sérum de contrôle Anti-HAV négatif ; puis 10 µl de ce mélange + 100 µl de Sérum de contrôle anti-HAV négatif).

Toutes les étapes de dilutions doivent impérativement être effectuées avec le Sérum de contrôle Anti-HAV négatif.

Solution d'emploi du Conjugué : prélever la quantité de Conjugué Anti-HAV/POD nécessaire, et la diluer au 1/41 avec le Tampon Conjugué (Anti-HAV). [Pour une plaque, ajouter 150 µl de Conjugué Anti-HAV/POD dans un flacon (6 ml) de Tampon Conjugué (Anti-HAV)].

Stabilités et conditions de conservation

Avant leur ouverture, tous les éléments du coffret Enzygnost® Anti-HAV se conservent à +2/+8°C jusqu'à la date indiquée sur l'étiquette.

Pour les stabilités et conditions de conservation après ouverture des flacons et après préparation des réactifs à leur dilution d'emploi, se reporter au tableau 1 en annexe.

Matériel nécessaire

BEP® II : pour la réalisation automatique de la distribution des réactifs et des étapes de lavage.
BEP® III : pour la réalisation automatique du test après la distribution des échantillons, et pour l'exploitation automatique du test.
BEP® 2000 : pour la réalisation entièrement automatique du test et de son exploitation.
Pipettes : pipettes à embouts interchangeables de 25, 50, 100 et 1000 µl
Incubateur : bain-marie couvert (+37 ± 1 °C)

Réalisation du test

Réalisation du test à l'aide du BEP® II

1. **Schéma de distribution :**

   Déterminer le nombre de cupules nécessaires (nombre d'échantillons à tester + 6 cupules pour les contrôles). Sortir du cadre les barrettes non utilisées dans le test, et les conserver pour une utilisation future (cf. Tableau 1).

   Pour une exploitation quantitative du test, établir une courbe d'étalonnage (cf. « Préparation des réactifs ») et prévoir un dosage en double de chaque concentration du standard (dans ce cas-là, le nombre de cupules nécessaires sera donc égal au nombre d'échantillons, plus 12 cupules pour les contrôles et les dilutions du standard).

2. **Distribution des Sérums standard, de contrôle et des échantillons :**

   Test qualitatif : distribuer dans les 4 premières cupules (A1 à D1) 25 µl de Sérum de contrôle Anti-HAV négatif, dans les 2 cupules suivantes (E1 et F1) 25 µl du Sérum standard Anti-HAV 80, puis dans les cupules suivantes 25 µl de chacun des échantillons à tester.

   Comme alternative, on peut également distribuer le Sérum standard Anti-HAV 80 une fois en début de série et une fois en fin de série.

Schéma de pipetage : distribuer dans 4 cupules 25 µl de Sérum de contrôle Anti-HAV négatif, dans une cupule 25 µl de Sérum standard Anti-HAV 80, puis dans les cupules suivantes 25 µl de chaque échantillon à tester. En fin de série ou de plaque, distribuer de nouveau 25 µl de Sérum standard Anti-HAV 80.

Test quantitatif : distribuer dans 4 cupules (A1, A2, B1 et B2) 25 µl de Sérum de contrôle Anti-HAV négatif, puis distribuer en double dans les 8 cupules suivantes 25 µl de chacune des quatre concentrations du Sérum standard Anti-HAV : 80 (C1 et C2), 40 (D1 et D2), 20 (E1 et E2) et 10 (F1 et F2). Dans les cupules suivantes, distribuer 25 µl de chacun des échantillons à tester (éventuellement prédilués si nécessaire). A la fin de cette première étape de distribution, enchaîner immédiatement la distribution de l'Antigène HAV.

3. **Distribution de l'Antigène**

   Ajouter dans chaque cupule contenant le standard, le contrôle ou un échantillon 50 µl de Solution Antigène, et enchaîner immédiatement la distribution du Conjugué.

4. **Distribution du Conjugué**

   Ajouter dans chaque cupule 50 µl de solution d'emploi du Conjugué (cf; "Remarque"), couvrir la plaque-test d'une feuille adhésive, et la placer immédiatement dans l'incubateur.

   Remarque :

   Pour éviter l'obtention de résultats erronés en réalisation manuelle du test, veiller lors de la distribution du Conjugué à ce que l'extrémité de la pipette ne touche pas le bord de la cupule, ni le mélange déjà présent dans la cupule.

5. **Incubation**

   Laisser incuber 2 heures ± 5 minutes à +37 ± 1°C, et enchaîner immédiatement le processus de lavage.

6. **Lavage**

   Retirer la feuille adhésive, aspirer le contenu de toutes les cupules, et laver 4 fois avec env. 0,3 ml de Solution de lavage.

   A la fin du lavage, enchaîner immédiatement la distribution du réactif suivant pour éviter le dessèchement des solutions.

7. **Distribution du Substrat**

   Ajouter dans chaque cupule 100 µl de solution d'emploi du Chromogène et couvrir la plaque d'une nouvelle feuille adhésive.

8. **Incubation du Substrat**

   Laisser incuber 30 ± 2 minutes à +18/+25°C à l'abri de la lumière.

9. **Arrêt de la réaction**

   Retirer la feuille adhésive et ajouter dans chaque cupule 100 µl de Solution d'arrêt POD en respectant le même rythme que pour la distribution du Substrat.

10. **Mesure**

    Procéder dans l'heure qui suit à une mesure photométrique à 450 nm. Il est recommandé de choisir 650 nm comme longueur d'onde de référence (à défaut, celle-ci peut être comprise entre 615 et 690 nm).

Réalisation du test à l'aide du BEP® III

Pour une réalisation du test sur le BEP® III, préparer les plaques jusqu'à la distribution des sérums standard, de contrôle et des échantillons (points 1 et 2 de « Réalisation du test à l'aide du BEP® II »). Toutes les étapes suivantes sont effectuées entièrement automatiquement par l'appareil (cf. Manuel d'utilisation du BEP® III). Ne pas couvrir les plaques d'une feuille adhésive. Après la distribution des sérums standard, de contrôle et des échantillons, placer immédiatement la plaque dans le BEP® III.

Les temps d'incubation prévus dans le logiciel du BEP® III peuvent varier par rapport à ceux du BEP® II pour des raisons techniques d'environnement (rythme des mesures de l'appareil). Ils ont cependant été validés pour la combinaison BEP® III/Enzygnost®.

Réalisation du test à l'aide du BEP® 2000

La distribution des sérums standard, de contrôle et des échantillons, ainsi que la réalisation du test sont effectuées entièrement automatiquement par l'appareil (cf. manuel d'utilisation du BEP® 2000).

Validation du test

Les différentes valeurs de densité optique obtenues pour les sérums de contrôle sont utilisées pour le calcul de la valeur moyenne si

$$D.O._{\text{nég}} \geq 0{,}700$$

$$-0{,}010 \leq D.O._{\text{ST 80}} \leq 0{,}300$$

Si une seule des densités optiques du Sérum de contrôle Anti-HAV négatif ne répond pas au critère ci-dessus, elle peut être négligée.

Les deux densités optiques obtenues pour le Sérum standard 80 doivent répondre au critère indiqué. A défaut, refaire le test.

Exploitation du test

L'exploitation est effectuée automatiquement par le BEP® 2000 ou le BEP® III. Se reporter aux manuels d'utilisation des appareils. Les chapitres suivants sont prévus pour une exploitation des résultats sans l'aide d'un logiciel.

Test qualitatif

Calculer la valeur moyenne des densités optiques obtenues pour le Sérum de contrôle Anti-HAV négatif, puis la valeur-seuil en multipliant cette valeur moyenne par le facteur 0,5.

$\overline{D.O.}_{nég}$ x 0,5 = valeur-seuil (cut off)

Le domaine de confiance est défini comme suit :

Valeur-seuil ± 10%

Selon les critères du test, les échantillons testés sont classés de la façon suivante :

Résultat du test :

1. $D.O._{échantillon}$ > cut off + 10% = négatif
2. $D.O._{échantillon}$ < cut off – 10% = positif
3. cut off – 10% ≤ $D.O._{échantillon}$ ≤ cut off + 10% = douteux

Les échantillons initialement trouvés dans un domaine de ±10% par rapport à la valeur-seuil (zone grise) doivent être considérés comme provisoirement douteux. Pour clarifier le résultat, retester l'échantillon, mais cette fois en double. Si la valeur moyenne du retest est trouvée soit inférieure à la valeur-seuil -10%, soit supérieure à la valeur-seuil +10%, le résultat initial douteux peut être négligé, et l'échantillon est rendu soit positif soit négatif. Si le retest ne permet toujours pas de classer l'échantillon en positif ni en négatif, rendre le résultat « douteux ».

Test quantitatif :

Pour une exploitation quantitative du test, calculer les valeurs moyennes des dosages en double de la série des concentrations du standard à 10, 20, 40 et 80 UI/l.

Lire les concentrations en anti-HAV des échantillons sur la courbe d'étalonnage ainsi établie. Si les échantillons ont été dilués, la concentration lue sur la courbe d'étalonnage doit être multipliée par le facteur de dilution.

Limites de réalisation du test

1. Ne pas utiliser d'échantillons de patients contenant de l'azide de sodium !
2. Ne pas utiliser d'échantillons contaminés.
3. Les anticoagulants comme l'héparine, l'EDTA et le citrate n'ont aucune influence sur les résultats du test.
4. L'utilisation d'échantillons lipémiques, hémolytiques, contenant des facteurs rhumatoïdes ou des ANA, ainsi que d'échantillons inactivés à la chaleur (1 h à +56°C) n'a pas d'influence sur les résultats du test.
5. Le Tampon/Substrat TMB, la solution d'emploi du Chromogène et la Solution d'arrêt POD ne doivent pas entrer en contact avec des ions de métaux lourds ni des substances oxydantes (ne pas utiliser de pipettes à parties métalliques au niveau du passage des solutions). La réaction du substrat ne doit pas être effectuée à proximité de désinfectants contenant de l'eau de Javel.
6. Une coloration bleue spontanée de la solution d'emploi du Chromogène avant son transfert dans la plaque indique une contamination ; préparer alors une nouvelle solution dans un récipient propre. Eviter tout contact de la peau avec les solutions sus-mentionnées.
7. La plaque-test doit rester immobile pendant toute la durée de l'incubation (la placer par ex. dans un bain-marie non circulant ou la fixer sur un support) ; veiller à ce que le fond des cupules soit en contact avec l'eau thermostatée.

   Si un conservateur est utilisé pour éviter la contamination de l'eau, veiller à ce que celle-ci ne touche pas la surface de la plaque ni n'entre dans les cupules au risque d'entraîner des réactions non spécifiques.
8. Les sérums de contrôle sont préparés à partir de sérums humains natifs. Aussi peuvent-ils devenir troubles, sans que cela ait d'influence sur les résultats du test.

Caractéristiques du test

Sensibilité et spécificité

Les résultats de l'étude de sensibilité et de spécificité sont résumés dans les tableaux 2 et 3 (en annexe).

Pour déterminer la sensibilité, un total de 878 échantillons anti-HAV-positifs a été testé, donnant une sensibilité entre 98,5 et 100% (test initial) et entre 99,0 et 100% (retest). La réactivité du test à détecter les échantillons de séroconversion a été testée sur un panel de 12 séroconversions. Les résultats ont montré que la sensibilité du test Enzygnost® Anti-HAV pour la détection des séroconversions correspondait à celle d'un test comparable. La sensibilité analytique a été déterminée à ≤ 20 UI/l par rapport au standard international de l'OMS. Néanmoins, on ne peut exclure que, dans le cadre d'une large utilisation du test, certains échantillons ne soient pas détectés.

Pour déterminer la spécificité, un total de 586 échantillons sanguins anti-HAV-négatifs a été testé, donnant une spécificité comprise entre 96,6 et 100% (test initial) et entre 98,3 et 100% (retest). Selon le collectif étudié ou la réalisation du test par ex., des valeurs différentes peuvent être obtenues. Selon l'état actuel des connaissances, un résultat positif avec le test anti-HAV ne permet pas avec certitude de conclure à une infection par le virus de l'hépatite A ni à une immunisation, de même qu'un résultat négatif ne permet pas avec certitude d'exclure la présence d'une infection par le virus de l'hépatite A ou d'une immunisation.

Reproductibilité

Les résultats de l'étude de répétabilité et de reproductibilité sont résumés dans le tableau 4 (en annexe). Les valeurs indiquées sont données à titre d'exemple. Selon la réalisation du test par ex., on peut obtenir des valeurs très divergentes.

Enzygnost et BEP sont des marques déposées de Dade Behring Marburg GmbH aux USA, en Allemagne et dans d'autres pays.

Dade Behring Marburg GmbH
Emil-von-Behring-Str. 76
D-35041 Marburg
www.dadebehring.com

CE

Tab. 1 Stabilités et conditions de conservation

Enzygnost® Anti-HAV

Réactif/Préparation	État	Conservation	Stabilité*
Enzygnost® Anti-HAV (plaque-test/barrettes)	Après ouverture	+2/+8°C dans sachet avec capsules dessicatives	6 semaines
Conjugué Anti-HAV/POD	Après ouverture	+2/+8°C	4 semaines
Tampon Conjugué	Après ouverture	+2/+8°C	4 semaines
Solution d'emploi du Conjugué	1/41	+2/+8°C +18/+25°C	4 semaines 1 semaine
Antigène HAV	Après ouverture	+2/+8°C	4 semaines
Sérum standard Anti-HAV 80 Sérum de contrôle Anti-HAV négatif	Après ouverture	+2/+8°C <-20°C	4 semaines 3 mois
Dilutions du Standard Anti-HAV (40, 20, 10 UI/ml)	Après préparation avec le Sérum standard Anti-HAV 80 juste ouvert	+2/+8°C	4 semaines
Chromogène TMB	Après ouverture	+2/+8°C	Jusqu'à la date de péremption
Tampon/Substrat TMB	Après ouverture	+2/+8°C	Jusqu'à la date de péremption
Solution d'emploi du Chromogène	1/11	+2/+8°C +18/+25°C dans un récipient fermé, à l'abri de la lumière	5 jours 8 heures
Solution de lavage POD (concentrée)	Après ouverture 1/20 1/20	+2/+8°C +2/+8°C +18/+25°C	Jusqu'à la date de péremption 1 semaine 1 jour
Solution d'arrêt POD	Après ouverture	+2/+8°C	Jusqu'à la date de péremption

* jamais au-delà de la date de péremption !

Tab. 2 Sensibilité

L'étude de sensibilité menée sur deux sites indépendants (K et M) a donné les résultats suivants :

Collectif d'échantillons	Nombre d'échantillons	Echantillons réactifs dans le test initial	Echantillons réactifs dans le retest
(M) anti-HAV positif	30	30	30
anti-HAV positif (plasmas)	30	30	30
anti-HAV/IgG positif	157	157	157
anti-HAV/IgM positif	84	84	84
séroconversions	12	sensibilité identique à celle d'un test comparable	
(K) anti-HAV positif	204	204	204
anti-HAV positif	205	202	203
anti-HAV positif	168	166	167

Tab. 3 Spécificité

L'étude de spécificité menée sur deux sites indépendants (K et M) a donné les résultats suivants :

Collectif d'échantillons	Nombre d'échantillons	Echantillons réactifs dans le test initial	Echantillons réactifs dans le retest
(M) sérums négatifs normaux	50	0	0
échantillons plasmatiques négatifs normaux	50	0	0
(K) sérums négatifs normaux	176	6	3
sérums négatifs normaux	310	9	5

Tab. 4 Reproductibilité

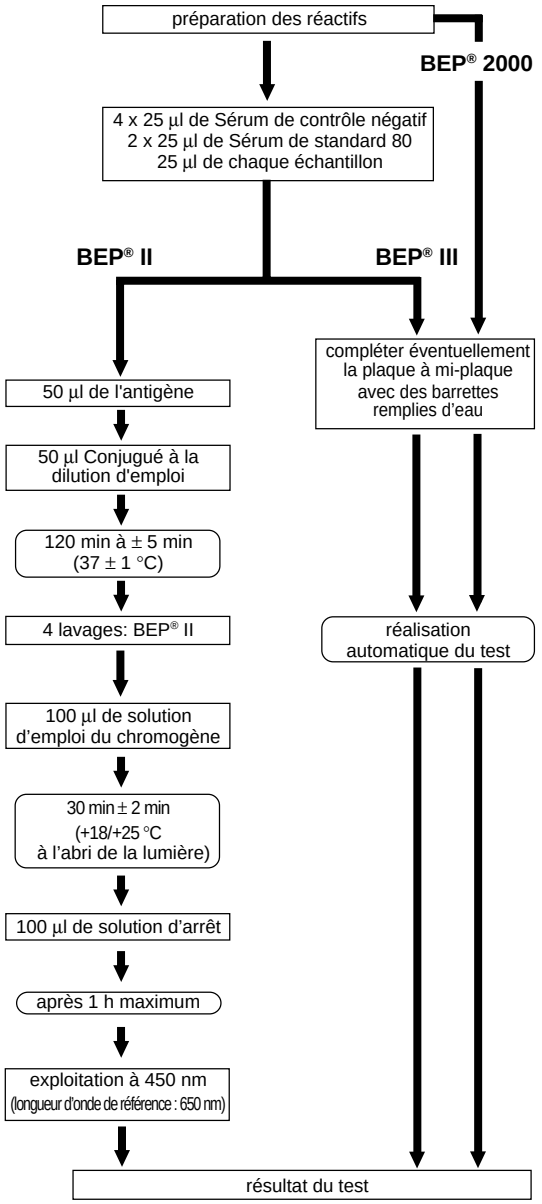
Dans l'étude de reproductibilité, les échantillons ont été testés 8 fois sur 5 jours. Le calcul des coefficients de variation (CV) a été effectué selon le modèle de variance à plusieurs facteurs.

Échantillon	Valeur moyenne de densité optique (D.O.)	% CV	
		Répétabilité	Reproductibilité
F1	1,203	3,6	7,8
F2	0,607	5,0	9,2
F3	0,331	9,4	7,8
F4	0,115	8,3	16,6

Tabl. 5 : Réalisation du test et programmation

Enzygnost® Anti-HAV

Réalisation du test (BEP® II, BEP® III, BEP® 2000)


préparation des réactifs
BEP® 2000
4 x 25 µl de Sérum de contrôle négatif
2 x 25 µl de Sérum de standard 80
25 µl de chaque échantillon
BEP® II
BEP® III
compléter éventuellement la plaque à mi-plaque avec des barrettes remplies d'eau
50 µl de l'antigène
50 µl Conjugué à la dilution d'emploi
120 min à ± 5 min (37 ± 1 °C)
4 lavages: BEP® II
réalisation automatique du test
100 µl de solution d'emploi du chromogène
30 min ± 2 min (+18/+25 °C à l'abri de la lumière)
100 µl de solution d'arrêt
après 1 h maximum
exploitation à 450 nm
(longueur d'onde de référence : 650 nm)
résultat du test

Programmation du menu pour le BEP® II

MENU NO	
OPERATE 1	YES
DISTRIBUTION DU ANTIGÈNE	
WASHINGS	0
ASPIRATE	NO
SOAKTIME	0
DISP VOL	50
CHANNEL NO	3
PHOT	NO
OPERATE 2	YES
DISTRIBUTION DU CONJUGUÉ	
WASHINGS	0
ASPIRATE	NO
SOAKTIME	0
DISP VOL	50
CHANNEL NO	2
PHOT	NO
OPERATE 3	YES
LAVAGE ET DISTRIBUTION DU CHROMOGÈNE	
WASHINGS	4
ASPIRATE	NO
SOAKTIME	0
DISP VOL	100
CHANNEL NO	4
PHOT	NO
OPERATE 4	YES
DISTRIBUTION DE LA SOLUTION D'ARRÊT	
WASHINGS	0
ASPIRATE	NO
SOAKTIME	0
DISP VOL	100
CHANNEL NO	5
PHOT	YES
MEAS WL	450
REF WL	650
BLK COR	NO
EVAL MODE	4
GEN CUT	NO
NEG CONT	4
MAX NEG	-
MIN NEG	0.700
FACT NEG	0.5
MAX POS	0.300
THRESH	-
CUT OFF	-

Enzygnost® Anti-HAV

Uso previsto

Metodo immunoenzimatico per l'identificazione degli anticorpi contro l'antigene del virus dell'epatite A nel siero e nel plasma.

Il test immunoenzimatico viene eseguito sugli analizzatori BEP® II, BEP® III e BEP® 2000 ELISA. Il test è stato sviluppato per analizzare campioni singoli e non pool di campioni. Il prodotto è soltanto per uso diagnostico *in vitro*.

Significato diagnostico

All'insorgere di un'infezione da epatite A l'attività degli anticorpi anti-HAV è sempre elevata[1,2,3,4]. Un risultato negativo in un paziente esclude quindi l'eziologia dell'infezione da epatite A. Poiché dopo un'infezione gli anticorpi anti-HAV sono rilevabili per tutta la vita, è possibile garantire con la loro identificazione una costante immunità; ciò costituisce un decisivo criterio di valutazione riguardo all'immunizzazione attiva mediante vaccinazione o impiego di immunoglobuline per la profilassi in seguito ad esposizione al virus in caso di contatti a rischio.

Nella valutazione quantitativa l'Enzygnost® Anti-HAV consente in base al siero standard anti-HAV (curva di verifica) di determinare quantitativamente il contenuto anticorpale HAV e di dichiararne il contenuto in UI/L riferito allo standard internazionale dell'OMS.

Principio del metodo

L'Enzygnost® Anti-HAV è un test immunoenzimatico basato sul principio del metodo a competizione.

Gli anticorpi specifici presenti nel campione in esame e gli anticorpi monoclonali anti-HAV coniugati POD competono per legarsi ai siti dell'antigene HAV, che a sua volta è impegnato nella reazione ad una fase come reagente. A seconda della concentrazione di anticorpi specifici nel campione si legherà all'antigene una quantità maggiore o minore di coniugato.

L'immunocomplesso così formatosi si lega quindi agli anticorpi specifici anti-HAV fissati alla superficie della piastra di microtitolazione.

Dopo l'eliminazione tramite lavaggio delle componenti non legate, si determina l'attività enzimatica del coniugato che si è legato.

La reazione enzimatica del substrato e del cromogeno (reazione di colore blu) viene interrotta mediante l'aggiunta di soluzione bloccante POD (reazione di colore giallo). L'intensità del colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione degli anticorpi presenti nel campione in esame.

Reagenti

Materiali forniti

Enzygnost® Anti-HAV	*1 x 96*
Enzygnost® Anti-HAV piastra test	1 pz.
Coniugato Anti-HAV/POD	1 x 0,4 mL
Tampone coniugato (Anti-HAV)	2 x 6 mL
Antigene HAV	2 x 6 mL
Siero standard Anti-HAV 80	1 x 0,5 mL
Siero di controllo Anti-HAV, negativo	1 x 6 mL
Soluzione di lavaggio POD (concentrato)	1 x 100 mL
Tampone/substrato TMB	1 x 30 mL
Cromogeno TMB	1 x 3 mL
Soluzione bloccante POD	1 x 100 mL
Flacone vuoto per soluzione d'uso del cromogeno	1 pz.
Fogli adesivi	6 pz.
Sacchetti in PE per la conservazione delle file di pozzetti no utilizzate	1 pz.
Tabella con i codici a barre	1 pz.
Istruzioni per l'uso	1 pz.

Composizione

Enzygnost® Anti-HAV (piastra test)

Piastra per microtitolazione sensibilizzata con anticorpi umani contro l'antigene del virus dell'epatite A.

Coniugato anti-HAV/POD
Anticorpo anti-HAV monoclonale (topo), coniugato con perossidasi (POD) in soluzione tampone Tris (0,05 mol/L).

Diluizione d'uso 1 + 40 in tampone coniugato (anti-HAV)
Conservante: fenolo (mass. 1 g/L)

Tampone coniugato (anti-HAV) per diluire il coniugato anti-HAV/POD:
contiene glicerina (100 g/L), Tween 20 (20 g/L), cloruro di sodio (8,8 g/L), EDTA (1,9 g/L), albumina bovina (1 g/L), poligelina e fosfato (50 mmol/L).

Conservante: fenolo (mass. 1 g/L)

Antigene-HAV:
Antigene del virus dell'epatite A da fibroblasti umani, inattivato.
Conservante: fenolo (mass. 1 g/L)

Siero standard anti-HAV 80:
Siero umano contenente anticorpi anti-HAV (valore nominale 80 ± 20 UI/L), riferito al preparato di riferimento dell'OMS.

Valore nominale di estinzione ≤ 0,3 E.
Conservante: fenolo (mass. 1 g/L)

Siero di controllo anti-HAV, negativo:
Siero umano privo di anticorpi anti-HAV.

Valore nominale di estinzione ≥ 0,7.
Conservante: fenolo (mass. 1 g/L)

Soluzione di lavaggio POD (concentrata) :
Soluzione di tampone fosfato (90 mmol/L) contenente Tween (18 g/L).
Conservante: fenolo (mass. 1 g/L)

Tampone substrato TMB:
perossido di idrogeno (ca. 0,1 g/L) in soluzione tampone-acetato (25 mmol/L).
Conservante: n-butanolo (mass. 1%).

Cromogeno TMB:
tetrametilbenzidina-cloridrato (5 g/L).

Soluzione bloccante POD: acido solforico 0,5 N
La confezione contiene un set combinato di reagenti. E' necessario utilizzare solo reagenti appartenenti tutti ad uno stesso lotto (ad esclusione della soluzione di lavaggio POD, la soluzione bloccante POD e soluzione d'uso del cromogeno preparata con i reagenti Cromogeno TMB e Tampone/Substrato TMB appartenenti tutti allo stesso lotto). La combinazione ammessa dei numeri di lotto a 6 cifre è quella stampata sulla confezione ed anche riportata nell'allegata tabella con i codici a barre.

Avvertenze e precauzioni

1. Solo per uso diagnostico *in vitro*
2. Ogni singola donazione di sangue utilizzata per la produzione del siero standard e dei sieri di controllo è stata esaminata per la ricerca dell'HBsAg e degli anticorpi anti-HCV, anti-HIV1 e anti-HIV2. Solo i campioni risultati negativi sono stati impiegati per la produzione. Tuttavia, poichè non è possibile escludere con assoluta certezza il pericolo di agenti patogeni[5], tutti i derivati da sangue umano devono essere trattati con le necessarie precauzioni rispettando le norme di sicurezza sul rischio biologico.
3. L'antigene HAV isolato da fibroblasti umani viene sottoposto ad un apposito processo di inattivazione (reazione con β-propiolattone). Tuttavia per sicurezza l'antigene HAV dovrebbe essere trattato con le dovute cautele[5].
4. Si consiglia l'uso di guanti di protezione durante l'intera esecuzione del test.
5. Per la distruzione del materiale solido infettivo si consiglia il trattamento in autoclave per almeno 1 ora a + 121 °C. Tutti i liquidi aspirati devono essere raccolti in due raccoglitori collegati in serie. I raccoglitori dovrebbero contenere un disinfettante adatto all'inattivazione dei virus patogeni umani. Osservare le concentrazioni ed i tempi di incubazione indicati dal produttore.

Preparazione dei reagenti

Prima dell'inizio del test portare tutti i reagenti ed i campioni in esame a +18/25 °C. Durante questa operazione **non** togliere la piastra test dal contenitore.

Per ogni piastra test diluire **20 mL di soluzione di lavaggio POD** (concentrata) con **400 mL** di acqua distillata o deionizzata.

Soluzione d'uso di cromogeno: per ogni piastra test diluire **1 mL di cromogeno TMB** con **10 mL di tampone/substrato TMB** nel flacone vuoto appositamente fornito e conservare chiuso al riparo dalla luce. Dopo l'uso, lavare accuratamente il flacone con acqua distillata.

Per motivi di capacità del flacone, non è possibile versare il contenuto di un flacone di cromogeno TMB direttamente nel flacone con il tampone/substrato TMB.

Per l'**esecuzione quantitativa** del test, il siero standard anti-HAV 80 deve essere diluito con il **siero di controllo anti-HAV negativo** come segue:

40 UI/L: diluizione 1: 2 (es. 100 µL siero standard anti-HAV 80 + 100 µL siero di controllo anti-HAV negativo)

20 UI/L: diluizione 1: 4 (es. 100 µL della diluizione contenente 40 UI/L standard + 100 µL siero di controllo anti-HAV negativo)

10 UI/L: diluizione 1: 8 (es. 100 µL della diluizione contenente 20 UI/L standard + 100 µL siero di controllo anti-HAV negativo)

Se le concentrazioni di anticorpi anti-HAV previste sono ≥ 60 UI/L, diluire i sieri o i plasmi come segue:

fino a 600 UI/L: diluizione 1:11 (es. 10 µL campione + 100 µL siero di controllo anti-HAV negativo)

fino a 6000 UI/L: diluizione 1:101 (es. 10 µL campione + 1000 µL siero di controllo anti-HAV negativo)

fino a 60000 UI/L: diluizione 1:1111 (es. 10 µL campione + 1000 µL siero di controllo anti-HAV negativo; 10 µL di questa diluizione + 100 µL di siero di controllo anti-HAV negativo).

Tutte le fasi di diluizione necessarie vanno preparate usando solo il relativo siero di controllo anti-HAV negativo.

Soluzione d'uso del coniugato: prelevare il quantitativo necessario di coniugato anti-HAV/POD e diluirlo 1 + 40 con il tampone coniugato (anti-HAV). [Aggiungere per ogni piastra test 150 µL di coniugato anti-HAV/POD in una confezione originale (6 mL) di tampone coniugato (anti-HAV)].

Conservazione e validità

Prima dell'apertura, tutte le componenti della confezione Enzygnost® Anti-HAV possono essere utilizzate fino alla data di scadenza indicata in etichetta, purché conservate a +2/+8 °C.

I dati completi relativi alla conservazione e alla stabilità dei reagenti diluiti, sono riportati nella Tabella 1 in appendice.

Apparecchiature richieste

BEP® II:	Per la distribuzione automatica del reagente e per il lavaggio
BEP® III:	Per l'esecuzione automatica del test dopo distribuzione del campione e per la valutazione dei risultati
BEP® 2000:	Per l'esecuzione completamente automatica del test e la valutazione dei risultati
Pipette:	Pipette a stantuffo da 25, 50, 100 e 1000 µL.
Incubatore:	bagnomaria coperto (+ 37 ± 1 °C).

Esecuzione del test

Esecuzione del test con BEP® II

1. **Schema di distribuzione**:

   definire il numero dei pozzetti necessari (numero dei campioni da esaminare più 6 pozzetti per i controlli). Togliere le file di pozzetti non utilizzate e conservarle per un successivo impiego (v. Tabella 1).

   Per il test quantitativo, allestire una curva di calibrazione (v. Lavoro di preparazione) le cui concentrazioni vanno rispettivamente esaminate in doppio (in tal caso il numero dei campioni necessari è dato dal numero dei campioni da esaminare più 12 pozzetti per i controlli e gli standard).

2. **Distribuzione dei campioni**:

   Test qualitativo: distribuire 25 µL/pozzetto di siero di controllo anti-HAV negativo in ciascuno dei primi 4 pozzetti (da A1 a D1), 25 µL di siero standard anti-HAV 80 nei due pozzetti successivi (da E1 a F1) e distribuire in ognuno dei successivi pozzetti 25 µL di campione.

   In alternativa allo schema di distribuzione sopra riportato, è possibile distribuire il siero standard anti-HAV 80 all'inizio ed alla fine della serie.

   Schema di distribuzione: distribuire 25 mL/pozzetto di siero di controllo anti-HAV negativo in 4 pozzetti, 25 µL di siero standard anti-HAV 80 nel pozzetto successivo, quindi distribuire 25 µL/ pozzetto del campione nei pozzetti successivi. Alla fine della serie/piastra distribuire ancora 25 µautL di siero standard anti-HAV 80.

   Test quantitativo: distribuire 25 µL/pozzetto di siero di controllo anti-HAV negativo in ciascuno dei primi 4 pozzetti (A1, A2, B1 e B2); quindi distribuire 25 µL/pozzetto di siero standard anti-HAV nei successivi due pozzetti, es. 80 UI/L nei pozzetti C1 e C2, 40 UI/L nei pozzetti D1 e D2, 20 UI/L nei pozzetti E1 e E2 e 10 UI/L nei pozzetti F1 e F2. Distribuire quindi 25 µL/pozzetto di campione nei successivi pozzetti (se necessario, prediluire).

   Al termine dell'operazione, procedere immediatamente con la fase di distribuzione dell'antigene.

3. **Distribuzione dell'antigene**:

   aggiungere 50 µL di soluzione antigene in ogni pozzetto contenente i campioni e procedere immediatamente con la distribuzione del coniugato.

4. **Distribuzione del coniugato**:

   aggiungere 50 µL di soluzione d'uso di coniugato in ogni pozzetto (v. nota), ricoprire la piastra con pellicola e metterla immediatamente nell'incubatore.

   Nota:

   in caso di esecuzione manuale, per evitare risultati falsamente positivi, la distribuzione del coniugato deve essere effettuata in modo che il puntale della pipetta non tocchi il bordo dei pozzetti e non venga a contatto con il campione.

5. **Incubazione**:

   incubare per 2 ore ± 5 min. a + 37 ± 1 °C, e procedere subito con la fase di lavaggio.

6. **Lavaggio**:

   rimuovere la pellicola, aspirare il liquido da ogni pozzetto e lavare 4x con ca. 0,3 mL/pozzetto di soluzione di lavaggio. Conclusa la fase di lavaggio, procedere subito con la dispensazione del reagente successivo (per evitare l'essiccamento dei pozzetti).

7. **Distribuzione del substrato**:

   distribuire in ogni pozzetto 100 µL di soluzione d'uso di cromogeno e ricoprire la piastra con nuova pellicola.

8. **Incubazione**:

   incubare per 30 ± 2 min. a + 18/25 ± 1 °C al riparo dalla luce.

9. **Arresto della reazione**:

   rimuovere la pellicola e aggiungere in ogni pozzetto 100 µL di soluzione bloccante POD, rispettando lo stesso ritmo seguito per "7. Distribuzione del substrato".

10. **Lettura**: eseguire la lettura fotometrica a 450 nm entro 1 ora.

    La lunghezza d'onda di riferimento consigliata è 650 nm, o se necessario, tra 615 e 690 nm.

Esecuzione del test con il BEP® III

Prima dell'esecuzione sul BEP® III, preparare le piastre fino alla fase di dispensazione del campione (punto 1-2 del paragrafo "Esecuzione del test con BEP® II). Tutte le fasi successive sono eseguite in maniera completamente automatica dall'analizzatore (v. manuale d'uso del BEP® III). Non coprire le piastre con la pellicola.

Terminata la dispensazione dei campioni, mettere subito la piastra sul BEP® III.

Le impostazioni dei tempi di incubazione nel software del BEP® III possono differire da quelli del BEP® II per motivi tecnici (velocità del sistema) ma sono state validate per l'Enzygnost® sul BEP® III.

Esecuzione del test con BEP® 2000

Le fasi di dispensazione del campione e la successiva esecuzione del test sono eseguite in maniera completamente automatica dall'analizzatore (v. manuale d'uso del BEP® 2000).

Validità del test

I singoli valori di estinzione dei sieri di controllo negativi vengono utilizzati per calcolare il valore medio, quando:

$$E_{neg.} \geq 0{,}700$$

$$-0{,}010 \leq E_{ST80} \leq 0{,}300$$

Se uno dei valori di estinzione del siero di controllo anti-HAV, negativo, non rientra nell'ambito indicato, può essere trascurato.

I valori di estinzione del siero standard 80 devono rientrare entrambi nell'ambito indicato. Se queste condizioni non vengono rispettate, il test deve essere ripetuto.

Valutazione del test

Sul BEP® 2000 e BEP® III, il calcolo dei risultati viene eseguito automaticamente. Consultare i rispettivi manuali d'uso. Per la valutazione dei risultati senza l'utilizzo del software, consultare i seguenti paragrafi.

Test qualitativo

Calcolare il valore di estinzione medio del siero di controllo anti-HAV negativo, quindi calcolare il cut-off moltiplicando per un fattore di 0,5.

$$\bar{E}_{neg.} \times 0{,}5 = \text{cut off}$$

Viene definito ambito dubbio:

$$\text{cut-off} \pm 10\%$$

Secondo i criteri del test, i campioni in esame vengono così classificati:

Risultato del test:

1. $E_{campione} > \text{cut off} + 10\% = \text{negativo}$
2. $E_{campione} < \text{cut off} - 10\% = \text{positivo}$
3. $\text{cut off} - 10\% \leq E_{campione} \leq \text{cut off} + 10\% = \text{dubbio}$

I campioni che nel test iniziale reagiscono con valori di estinzione in un ambito di ± 10% del cut-off (ambito dubbio) devono essere considerati temporaneamente dubbi. Per definire il risultato, il test deve essere ripetuto, ma questa volta in doppio.

Se nella ripetizione del test il valore medio della determinazione in doppio risultasse inferiore al cut-off - 10% o maggiore + 10%, allora il risultato dubbio iniziale può essere trascurato e il campione va considerato rispettivamente positivo o negativo.

Se anche successivamente non fosse possibile classificare il campione come positivo o negativo, il risultato del test viene definito "dubbio".

Test quantitativo:

Per la valutazione quantitativa, calcolare i valori medi di estinzione della determinazione in doppio delle diluizioni standard 10, 20,40 e 80 UI/L.

Le concentrazioni di anti-HAV nei campioni si leggono vengono lette da questa curva standard. Se il campione è stato diluito, moltiplicare la concentrazione ottenuta dalla curva standard per il fattore di diluizione.

Limitazioni della procedura

1. Non utilizzare campioni di pazienti contenenti sodio azide!
2. I campioni contaminati da microbi non dovrebbero essere utilizzati.
3. Gli anticoagulanti quali eparina, EDTA e citrato non influenzano il risultato del test.
4. I campioni lipemici e emolitici e quelli contenenti fattori reumatoidi o ANAs, e campioni inattivati con il calore (1 ora, 56°C) non interferiscono con il risultato del test.
5. Il Tampone/Substrato TMB, la Soluzione d'uso del cromogeno e la Soluzione bloccante POD non devono venire a contatto con ioni di metalli pesanti o con sostanze ossidanti (non utilizzare pipette con parti metalliche che sono a diretto contatto con i liquido). Non eseguire le reazioni del substrato in prossimità di disinfettanti contenenti ipoclorito.
6. Se la Soluzione d'uso del cromogeno presenta spontaneamente una colorazione blu prima di essere trasferita nella piastra test, ciò indica che la soluzione è contaminata; in tal caso preparare una nuova soluzione in un contenitore pulito.
7. Durante la fase di incubazione, la piastra deve essere protetta da vibrazioni (es. su un supporto fisso oppure a bagnomaria senza circolazione d'acqua); i pozzetti devono essere a contatto con l'acqua termostatata.
   Se vengono utilizzati conservanti per evitare la contaminazione dell'acqua, occorre fare attenzione a che la superficie superiore della piastra ed i pozzetti non vengano a contatto con queste soluzioni, in quanto simili contaminazioni possono produrre reazioni aspecifiche.
8. I sieri di controllo sono prodotti utilizzando siero umano nativo. Pertanto possono diventare torbidi senza però interferire sul risultato del test.

Caratteristiche del test

Sensibilità e specificità

I risultati dello studio sulla sensibilità e sulla specificità sono riassunti nelle tabelle 2 e 3 (in appendice).

Per la valutazione della sensibilità, sono stati esaminati 878 campioni anti-HAV positivi, e si è riscontrata una sensibilità del 98,5 - 100 % (nell'analisi iniziale) e del 99,0-100 % (nella ripetizione). La reattività del test per i campioni in sieroconversione è stata verificata analizzando 12 pannelli di sieroconversione. L'Enzygnost® Anti-HAV ha dimostrato una sensibilità corrispondente a quella di test analoghi in merito alla precocità di rilevamento della sieroconversione.

La sensibilità analitica è risultata essere ≤ 20 UI/L secondo lo standard internazionale dell'OMS.

Non si può tuttavia escludere la possibilità che, con l'impiego del test su vasta scala, qualche campione possa risultare non identificato. Per la valutazione della specificità, sono stati esaminati complessivamente 586 campioni di sangue anti-HAV negativo ed è risultata una specificità del 96,6 - 100 % (nel test iniziale) e del 98,3 - 100 % (nella ripetizione del test). Possibili scostamenti da tali valori possono dipendere dal tipo di collettività esaminata, dalla modalità di esecuzione del test, o da altre variabili.

Le attuali conoscenze indicano che un risultato di un test anti-HAV positivo non indica la certezza di un'infezione da epatite A oppure di un'immunità recente, così come un risultato negativo non esclude in modo attendibile la presenza di un'infezione da epatite A oppure una immunità recente.

Riproducibilità

I risultati per la riproducibilità intra/inter-serie sono riassunti nella Tabella 4 (in appendice). Questi dati si basano su calcoli esemplificati. Deviazioni da questi valori sono, senz'altro, possibili e sono dovute alle differenti procedure analitiche, ecc.

Enzygnost e BEP sono marchi registrati della Dade Behring Marburg GmbH negli Stati Uniti, Germania e altri paesi.

Dade Behring Marburg GmbH
Emil-von-Behring-Str. 76
D-35041 Marburg
www.dadebehring.com

CE

Tab. 1: Enzygnost® Anti-HAV

Conservazione e validità

Campioni/Reagenti	**Condizioni**	**Conservazione**	**Stabilità***
Enzygnost® Anti-HAV (piastra test /pozzetti rimanenti)	dopo apertura	+ 2/+8 °C (nel sacchetto con l'essiccante)	6 settimane
Coniugato anti-HAV/POD	dopo apertura	+ 2/+8 °C	4 settimane
Tampone coniugato	dopo apertura	+ 2/+8 °C	4 settimane
Coniugato diluito, pronto per l'uso	1 + 40	+ 2/+8 °C +18/+25 °C	4 settimane 1 settimana
Antigene HAV	dopo apertura	+ 2/+8 °C	4 settimane
Siero standard anti-HAV 80 Siero di controllo anti-HAV, negativo	dopo apertura	+2/+8 °C < -20 °C	4 settimane 3 mesi
Diluizione dello standard anti-HAV (40,20,10 UI/L)	dopo l'aggiunta del siero st. d anti-HAV 80 appena aperto	+ 2/+8 °C	4 settimane
Cromogeno TMB	dopo apertura	+ 2/+8 °C	data di scadenza
Tampone/Substrato TMB	dopo apertura	+ 2/+8 °C	data di scadenza
Soluzione d'uso di cromogeno	1+10	+ 2/+8 °C + 18/+25 °C (ben chiuso, protetto dalla luce)	5 giorni 8 ore
Soluzione di lavaggio POD (concentrata)	dopo apertura 1:20 1:20	+ 2/+8 °C + 2/+8 °C + 18/+25 °C	data di scadenza 1 settimana 1 giorno
Soluzione bloccante POD	dopo apertura	+ 2/+8 °C	data di scadenza

* in nessun caso oltre la data di scadenza

Tab. 2 Sensibilità

Nella valutazione della sensibilità sono stati ottenuti, in due centri indipendenti (K, M), i seguenti dati:

Insieme di campioni	Numero di campioni	Reattività iniziale	Reattività dopo ripetizione
(M) Anti-HAV pos.	30	30	30
Anti-HAV pos. (Plasmi)	30	30	30
Anti-HAV/IgG pos.	157	157	157
Anti-HAV/IgM pos.	84	84	84
Sieroconversione	12	la sensibilità corrisponde a quella di test analoghi	
(K) Anti-HAV pos.	204	204	204
Anti-HAV pos.	205	202	203
Anti-HAV pos.	168	166	167

Tab. 3 Specificità

Nella valutazione della specificità sono stati ottenuti, in due centri indipendenti (K, M), i seguenti risultati:

Insieme di campioni	Numero di campioni	Reattività iniziale	Reattività dopo ripetizione
(M) Sieri normali negativi	50	0	0
Plasmi normali negativi	50	0	0
(K) Sieri normali negativi	176	6	3
Sieri normali negativi	310	9	5

Tab. 4 Riproducibilità

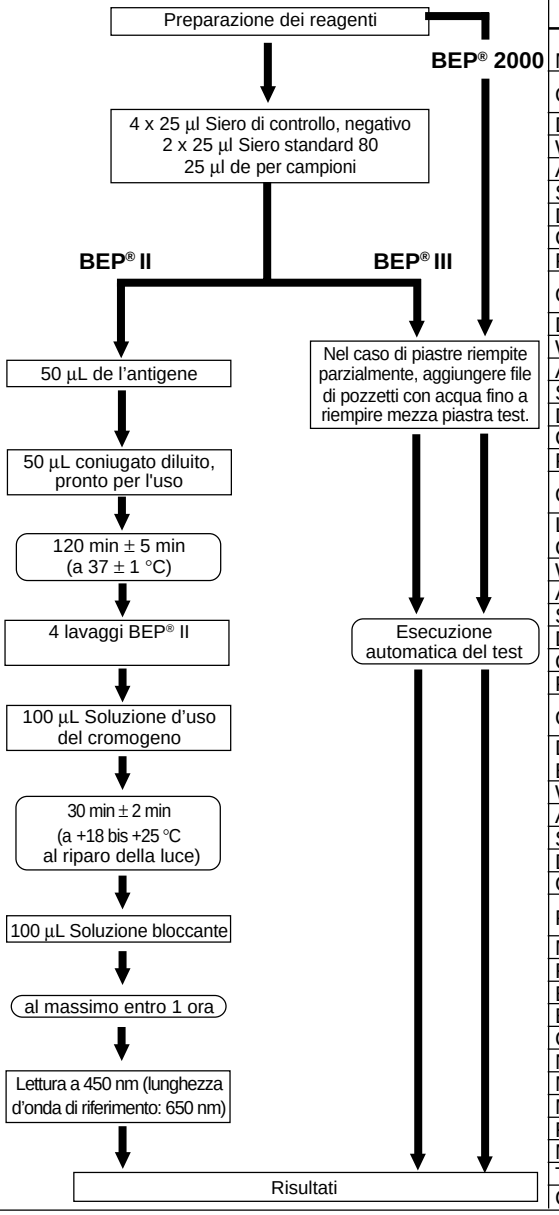
Nella valutazione per la riproducibilità, i campioni sono stati analizzati ripetendo le determinazioni 8 volte per 5 giorni. E' stato trovato un coefficiente di variazione (CV) secondo il modello del componente della varianza.

Campioni	Valore medio (E)	% CV	
		Intra-assay	Inter-assay
F1	1,203	3,6	7,8
F2	0,607	5,0	9,2
F3	0,331	9,4	7,8
F4	0,115	8,3	16,6

Tabella 5: Esecuzione e programmazione del test

Enzygnost® Anti-HAV

Esecuzione del test (BEP® II, BEP® III, BEP® 2000)


Preparazione dei reagenti
BEP® 2000
4 x 25 µl Siero di controllo, negativo
2 x 25 µl Siero standard 80
25 µl de per campioni
BEP® II
BEP® III
50 µL de l'antigene
Nel caso di piastre riempite parzialmente, aggiungere file di pozzetti con acqua fino a riempire mezza piastra test.
50 µL coniugato diluito, pronto per l'uso
120 min ± 5 min (a 37 ± 1 °C)
4 lavaggi BEP® II
Esecuzione automatica del test
100 µL Soluzione d'uso del cromogeno
30 min ± 2 min (a +18 bis +25 °C al riparo della luce)
100 µL Soluzione bloccante
al massimo entro 1 ora
Lettura a 450 nm (lunghezza d'onda di riferimento: 650 nm)
Risultati

Programmazione del menù per il

BEP® II

MENU NO	
OPERATE 1	YES
DISPENSAZIONE ANTIGENE	
WASHINGS	0
ASPIRATE	NO
SOAKTIME	0
DISP VOL	50
CHANNEL NO	3
PHOT	NO
OPERATE 2	YES
DISPENSAZIONE CONIUGATO	
WASHINGS	0
ASPIRATE	NO
SOAKTIME	0
DISP VOL	50
CHANNEL NO	2
PHOT	NO
OPERATE 3	YES
LAVAGGIO E DISPENSAZIONE CHROMOGENO	
WASHINGS	4
ASPIRATE	NO
SOAKTIME	0
DISP VOL	100
CHANNEL NO	4
PHOT	NO
OPERATE 4	YES
DISPENSAZIONE SOLUZIONE BLOCCANTE	
WASHINGS	0
ASPIRATE	NO
SOAKTIME	0
DISP VOL	100
CHANNEL NO	5
PHOT	YES
MEAS WL	450
REF WL	650
BLK COR	NO
EVAL MODE	4
GEN CUT	NO
NEG CONT	4
MAX NEG	-
MIN NEG	0.700
FACT NEG	0.5
MAX POS	0.300
THRESH	-
CUT OFF	-

Enzygnost® Anti- HAV

Campos de aplicación y objetivos

Ensayo inmunoenzimático para el reconocimiento de los anticuerpos contra el antígeno virus de la hepatitis A en sueros y plasmas humanos. La realización del ensayo inmunológico se lleva a cabo en los ELISA Prozessoren BEP® II, BEP® III y BEP® 2000. El test se desarrolló para la investigación de muestras individuales, no de muestras en pool. El producto debe ser usado únicamente en diagnósticos in vitro.

Significado diagnóstico

Al comienzo de una hepatitis A (1,2,3,4) se puede reconocer siempre el anti-HAV y en la mayoría de los casos con actividad muy elevada. Un resultado negativo para un paciente excluye, por lo tanto, a la hepatitis A como la causa de la dolencia. Dado que el anti-HAV después de una enfermedad permanece reconocible toda una vida, con este reconocimiento se puede garantizar la existencia de una inmunidad, un criterio de decisión muy importante para la pregunta de inmunización activa mediante vacunación o por el uso de inmunoglobulinas para profilaxis post-exposición en contactos con riesgo.

El Enzygnost® Anti-HAV permite con la valoración cuantitativa, en base a un suero estándar Anti-HAV (curva de calibración), una determinación cuantitativa del contenido de anticuerpo HAV y su declaración en UI/l con relación a un estándar internacional de la OMS.

Principio del método

El Enzygnost® Anti-HAV es un ensayo inmunoenzimático según el principio de ensayo competitivo.

Los anticuerpos específicos contenidos en la muestra a investigar y los anticuerpos contra HAV conjugados con POD compiten por el sitio de unión del antígeno HAV, que igualmente se añade como reactivo componente del ensayo de una etapa. Dependiendo de la concentración de anticuerpos específicos existentes en la muestra, se puede unir mayor o menor cantidad de conjugado al antígeno.

El complejo inmunológico formado se une al anticuerpo HAV específico, fijado a la superficie de la placa de microtitulación.

Después de retirar por lavado, los componentes que no se han unido, se determina la actividad enzimática ligada del conjugado. La transformación enzimática del sustrato y del cromógeno (reacción de color azul) se va a interrumpir añadiendo la solución de detenimiento POD (reacción de color amarillo). La intensidad del color es indirectamente proporcional a la concentración de anticuerpos existente en la muestra.

Reactivos

Contenido del envase comercial

Enzygnost® Anti- HAV	*1 x 96*
Enzygnost® Anti- HAV placa de prueba	1 unidad
Conjugado Anti- HAV/POD	1 x 0,4 ml
Tampón para conjugado (Anti- HAV)	2 x 6 ml
Antígeno- HAV	2 x 6 ml
Suero estándar 80 Anti- HAV	1 x 0,5 ml
Suero control Anti-HAV, negativo	1 x 6 ml
Solución de lavado POD (concentrado)	1 x 100 ml
Tampón/sustrato TMB	1 x 30 ml
Cromógeno TMB	1 x 3 ml
Solución de detenimiento POD	1 x 100 ml
Frasco vacío para la solución de uso del cromógeno	1 unidad
Láminas adhesivas	6 unidades
Bolsa de PE para guardar los elementos no necesarios	1 unidad
Tabla de valores Barcode	1 unidad
Boletín informativo	1 unidad

Composición

Enzygnost® Anti-HAV (placa de prueba)

Placa de microtitulación recubierta con anticuerpo humano contra el antígeno virus de la hepatitis A.

Conjugado Anti-HAV/ POD Anti-HAV monoclonal (ratón) conjugado con peroxidasa (POD), en solución tampón de Tris (0,05 mol/l)Dilución para usar: 1 + 40 en tampón para conjugado (Anti-HAV)
Medio de conservación: Fenol (máx. 1 g/l)

Tampón para conjugado (Anti-HAV) como medio de dilución para el conjugado Anti-HAV/POD:

Contiene glicerina (100 g/l), Tween 20 (20 g/l), cloruro de sodio (8,8 g/l), EDTA (1,9 g/l), albúmina bovina (1 g/l), poligelina y fosfatos (50 mmol/l)
Medio de conservación: Fenol (máx. 1 g/l)

Antígeno-HAV: Antígeno virus de la hepatitis A obtenido de fibroblastos humanos, inactivado
Medio de conservación: Fenol (máx. 1 g/l)

Suero estándar 80 Anti-HAV:

Suero humano con anticuerpos contra HAV (nominalmente 80 $\pm$ 20 UI/l), en relación con un preparado de referencia
Valor normativo de extinción $\leq$ 0,3 E
Medio de conservación: Fenol (máx. 1 g/l)

Suero control Anti-HAV, negativo:

Suero humano sin anticuerpos contra HAV
Valor normativo de extinción $\geq$ 0,7
Medio de conservación: Fenol (máx. 1 g/l)

Solución de lavado POD (concentrado)

Solución tampón de fosfato (90 mmol/l) conteniendo Tween (18 g/l)
Medio de conservación: Fenol (máx. 1 g/l)

Tampón/Sustrato TMB

Peróxido de hidrógeno (aprox. 0,1 g/l) en solución tampón de acetato (25 mmol/l)
Medio de conservación: n-Butanol (máx. 1%)

Cromógeno TMB:

Clorhidrato de tetrametilbencidina (5 g/l)

Solución de detenimiento POD: Ácido sulfúrico 0,5 N

Los reactivos (con excepción de la solución de lavado POD, la solución de detenimiento POD y la solución de uso del cromógeno preparada a partir de los reactivos dependientes del lote, cromógeno TMB y Tampón/sustrato TMB)) sólo se pueden utilizar juntos si provienen del mismo lote, esto es, sólo en la combinación con el mismo número de 6 cifras (Nr. de Lote) que está impreso en el envase o que se puede tomar de la Tabla Barcode incluida en éste.

Advertencias y medidas de seguridad

1. Sólo para ser utilizado en diagnósticos *in-vitro*
2. Cada donación individual de sangre, destinada a la preparación de los sueros estándar y de control ha sido sometida a pruebas para detectar el HBsAg, anti-HCV, anti-HIV 1 y anti-HIV 2. Para la elaboración se van a utilizar únicamente donaciones con resultados negativos.

   Independientemente de esto, todos los materiales obtenidos a partir de sangre humana deben ser manipulados con las precauciones necesarias, siguiendo las medidas de seguridad recomendadas en caso de riesgo biológico, puesto que nunca se puede excluir completamente la existencia de agentes patógenos (5)
3. El antígeno-HAV aislado de fibroblastos humanos se somete a un reconocido proceso de inactivación del virus (transformación con β-propiolactona). Por razones de seguridad se debe tratar, de todas maneras, el antígeno-HAV con las correspondiente medidas de seguridad (5).
4. Se aconseja utilizar guantes de seguridad durante el desarrollo del test.
5. Para la eliminación del material infeccioso sólido se recomienda colocarlo en el autoclave por lo menos 1 hora a + 121°C. Las soluciones aspiradas se deben recoger en dos recipientes conectados uno con el otro. Los recipientes deben contener un medio de desinfección apropiado para inactivar virus patógenos humanos. Deben observarse la concentración y el tiempo de acción dados por el fabricante.

Preparación de reactivos

Antes de empezar el test llevar todos los reactivos y las muestras a investigar a una temperatura entre +18 y +25°C **. No** retirar la placa de pruebas del envase que la contiene.

Por cada placa de prueba diluir **20 ml de la solución de lavado POD** (concentrado) a **400 ml** con agua destilada o desionizada.

Solución de uso del cromógeno: Por cada placa de prueba diluir **1 ml de cromógeno TMB con 10 ml de tampón/sustrato TMB,** en el frasco plástico vacío adjunto y mantener cerrado protegido de la luz. Después de su uso, enjuagar cuidadosamente el frasco con agua destilada.

Por razones técnicas (sobrellenado) no está permitido verter el contenido del cromógeno TMB en el frasco de tampón/sustrato TMB.

Para el **procedimiento cuantitativo** se deben preparar las siguientes diluciones del suero estándar 80 Anti- HAV con el **suero control Anti-HAV, negativo**:

40 UI/l: Dilución 1:2 (por ej., 100 µl suero estándar 80 Anti-HAV + 100 µl suero control Anti-HAV, negativo).

20 UI/l: Dilución 1:4 (por ej., 100 µl del suero estándar 40 + 100 µl suero control Anti-HAV, negativo).

10 UI/l: Dilución 1:8 (por ej., 100 µl del suero estándar 20 + 100 µl suero control Anti-HAV, negativo).

Si se esperan **concentraciones de anti HAV ≥ 60 UI/l** los **sueros o plasmas** se deben diluir de la siguiente manera:

Hasta 600 UI/l dilución 1:11 (por ej., 10 µl de muestra + 100 µl de suero control Anti-HAV, negativo).

Hasta 6000 UI/l dilución 1:101 (por ej., 10 µl de muestra + 1000 µl de suero control Anti-HAV, negativo).

Hasta 60 000 UI/l dilución 1:1111 (por ej., 10 µl de muestra + 1000 µl de suero control Anti-HAV, negativo y de esto 10 µl + 100 µl de suero control Anti-HAV, negativo).

Todas las etapas necesarias para la dilución se deben realizar únicamente con el suero control Anti-HAV, negativo correspondiente.

Solución de uso del conjugado: Tomar la cantidad necesaria del conjugado Anti-HAV/POD y diluirlo 1 + 40 con el tampón para conjugado (Anti-HAV). [por cada placa de prueba agregar 150 µl de conjugado Anti-HAV/POD a un frasco original (6 ml) de tampón para conjugado (Anti-HAV)]

Estabilidad y almacenaje

Todos los componentes del embace combinado Enzygnost® Anti-HAV aún cerrados, conservados a una temperatura entre +2 y +8°C, son utilizables hasta las fechas de vencimiento dadas en las etiquetas.

La estabilidad y las condiciones de almacenamiento de los envases ya abiertos o de los reactivos ya diluidos listos para el uso, se pueden tomar de la Tabla 1 del anexo.

Equipo necesario:

BEP® II:	Para la realización automática de la distribución de los reactivos y de las etapas de lavado
BEP® III:	Para la realización automática del test después de distribuir las muestras, así como, para la valoración
BEP® 2000:	Para la realización y valoración completamente automática del test
Pipetas:	Pipetas de émbolo: 20, 50, 100 y 1000 µl
Incubador:	Baño de agua, cubierto (+37 ± 1°C)

Procedimiento

Procedimiento en el BEP® II

1. **Esquema de distribución:**

   Determinar el número necesario de pocillos de la placa (número de muestras a investigar + 6 pocillos para los controles). Los elementos de la placa de prueba no utilizados se deben retirar del marco que los contiene y almacenarse para ser usados posteriormente (ver Tabla 1).

   Para la valoración cuantitativa se prepara una curva estándar de referencia (ver trabajos preliminares), para la cual cada concentración se toma en una doble determinación (en este caso, el número de muestras a investigar más 12 pocillos para controles y serie de estándares)

2. **Dosificación de las muestras:**

   Ensayo cualitativo: Pipetear en 4 pocillos (A1 hasta D1) 25 µl, por c/u, del suero de control Anti-HAV negativo, en 2 pocillos (E1 y F1) 25 µl, por c/u, del suero estándar 80 Anti-HAV y en los siguientes pocillos 25 µl de c/u de las muestras.

   Como alternativa al esquema de pipeteo arriba mencionado, está también permitido colocar el suero estándar 80 Anti-HAV una vez al comienzo y una vez al final de la serie de medidas.

Esquema de pipeteo: Dosificar en cuatro pocillos 25 µl, por c/u, de suero control Anti-HAV, negativo, en un pocillo 25 µl de suero estándar 80 Anti-HAV, en los siguientes pocillos 25 µl de c/u de las muestras y al final de la serie o de la placa de prueba otra vez 25µl de suero estándar 80 Anti-HAV.

Ensayo cuantitativo: Pipetear en 4 pocillos (A1,A2,B1 y B2) 25 µl, por c/u, de suero control Anti-HAV, negativo y a continuación en 2 pocillos 25 µl, por c/u, del correspondiente suero estándar Anti-HAV 80 (C1 y C2), 40 (D1 y D2), 20 (E1 y E2), 10 (F1 y F2). En los siguientes pocillos dosificar 25 µl de c/u de las muestras (en caso necesario, diluir).

Al terminar la dosificación de las muestras continuar inmediatamente con adición del antígeno.

3. **Dosificación del antígeno**

   Añadir a las muestra ya agregadas en cada pocillo 50 µl de la solución de antígeno y seguir de inmediato con la dosificación del conjugado.

4. **Dosificación del conjugado**

   Igualmente añadir 50 µl de solución de uso del conjugado a cada muestra y antígeno (ver advertencia), cubrir la placa de prueba con la lámina adhesiva y colocar directamente en el incubador.

   Advertencia:

   Para evitar resultados falsos en el procedimiento manual, la dosificación del conjugado debe hacerse de tal manera que la punta de la pipeta no toque el borde de la cavidad y no entre en contacto con el líquido de la muestra.

5. **Incubación**

   Incubar 2 horas ± 5 min. a 37 ± 1°C. Lavar inmediatamente después.

6. **Lavado**Retirar la lámina adhesiva, aspirar el contenido de todos los pocillos y lavar 4 veces con aprox. 0,3 ml de la solución de lavado cada vez. Después de la última etapa continuar inmediatamente con la dosificación de los reactivos para evitar sequedad.

7. **Distribución del sustrato**

   Agregar en cada pocillo 100 µl de solución de cromógeno lista para el uso. Cubrir la placa con una nueva lámina adhesiva.

8. **Incubación del sustrato:**

   Incubar 30 ± 2 min. entre +18 y +25°C protegiendo de la luz.

9. **Reacción de detenimiento:**

   Retirar la lámina adhesiva y agregar en cada pocillo 100 µl de solución de detenimiento POD; mantener el mismo ritmo que en el punto 7.

10. **Medición:**

    Realizar la medición en el fotómetro a 450 nm en el término de una hora.

    Como longitud de onda para la medida de referencia, se recomienda 650 nm (en caso dado entre 615 y 690 nm).

Procedimiento en el BEP® III

Para la realización del test en el BEP® III, las placas de prueba se deben preparar hasta la distribución de las muestras (punto 1 hasta punto 2 del "Procedimiento en el BEP® II"). Todas las etapas subsiguientes van a ser realizadas de forma completamente automática por el aparato (ver manual de operaciones del BEP® III). No aplique lámina adhesiva a las placas. Después de terminar la dosificación de las muestras colocar la placa inmediatamente en el BEP® III.

Los tiempos de incubación dados en el software del BEP® III, pueden desviarse de los dados para el proceso en el BEP® II, debido a razones técnicas (ritmo del aparato), pero están validados en la combinación BEP® III/Enzygnost®.

Procedimiento en el BEP® 2000

La distribución de las muestras y la realización subsiguiente del test se efectúa de forma completamente automática por el aparato (ver manual de operaciones del BEP® 2000).

Validación del test

Los valores aislados de extinción para el suero control se usan para el cálculo del valor promedio si

$$E_{neg.} \geq 0{,}700$$

$$-0{,}010 \leq E_{ST80} \leq 0{,}300$$

Si entre los valores de extinción del suero control Anti-HAV, negativo, existe un valor por fuera de las especificaciones, éste puede excluirse.

Los dos valores de extinción del suero estándar 80 deben cumplir con las especificaciones. Si estas condiciones no se cumplen, se debe repetir el test.

Evaluación del test

La evaluación con el BEP® 2000 o con el BEP® III, se realiza automáticamente. Para esto consultar los manuales de operaciones. Los siguientes capítulos son para tener en cuenta en el caso de evaluaciones sin la ayuda del software.

Ensayo cualitativo

Obtener el valor promedio de los valores de extinción del suero control Anti-HAV, negativo. Para calcular el valor límite se multiplica el valor de extinción promedio del suero control Anti-HAV, negativo por el factor 0,5:

$\bar{E}_{neg.}$ x 0,5 = Valor límite (cut off)

El rango limítrofe se define:

Valor límite ± 10%

Según los criterios del ensayo las muestras se definen de la siguiente manera:

Resultados del test:

1. $E_{muestra}$ > cut off + 10% = negativa
2. $E_{muestra}$ < cut off - 10% = positiva
3. cut off - 10% ≤ $E_{muestra}$ ≤ cut off + 10% = valor limítrofe

Las muestras que en un ensayo inicial reaccionan con valores de extinción en un rango de ± 10% del valor límite (rango limítrofe), deben ser tomadas provisionalmente como de valor limítrofe. Para aclarar estos resultados debe medirse la muestra nuevamente, pero esta vez en una doble determinación .

Si al repetir, el valor promedio de la doble determinación es menor que el valor límite - 10% o mayor que el valor límite + 10%, se puede eliminar el valor límite inicial y declarar la muestra como positiva o negativa.

Si después de la repetición tampoco es posible clasificar la muestra como positiva o negativa, el resultado del test es „valor limítrofe“.

Ensayo cuantitativo:

Para la valoración cuantitativa se van a determinar los coeficientes de extinción promedio de las dos determinaciones de las serie estándar 10, 20, 40 y 80 UI/l.

Basados en esta curva estándar se va a determinar la concentración de anti-HAV en la muestra.

Si la muestra ha sido diluida, la concentración leída en la curva debe ser multiplicada por el factor de dilución.

Limitaciones del procedimiento

1. No utilizar material del paciente que contenga azida sódica!
2. No utilizar muestras contaminadas microbiológicamente.
3. Los anticoagulantes como heparina, EDTA y citrato no influyen sobre los resultados del test.
4. Muestras lipémicas, hemolíticas, muestras que contengan factor reumatoideo, muestras con ANA, así como muestras inactivadas por calor (1h, 56°C) no presentan ninguna influencia sobre el test.
5. El Tampón/sustrato PMB, la solución de uso del cromógeno y la solución de detenimiento POD no deben entrar en contacto con iones de metales pesados o sustancias oxidantes (no utilizar pipetas con componentes metálicos). No efectuar la reacción del sustrato en la cercanía de medios de desinfección que contengan hipoclorito.
6. Una coloración azul espontánea de la solución de uso del cromógeno antes de colocarla en la placa de prueba indica una contaminación; prepare una nueva solución en un recipiente limpio. Evite el contacto de la piel con estas soluciones.
7. La placa de prueba debe mantenerse en reposo durante la incubación (por ej., con flotadores fijos o en un baño de agua no circulante); las cavidades deben estar en contacto con el agua temperada. Si se utilizan agentes de conservación para evitar la contaminación del agua, se debe tener mucho cuidado, de que ni la superficie de la placa de prueba ni los pocillos entren en contacto con esta solución, ya que este tipo de contaminaciones puede producir reacciones no específicas.
8. Los sueros de control son fabricados utilizando sueros humanos. Por esta razón, puede aparecer turbidez, la cual sin embargo no influye en el resultado del test.

Características del test

Sensibilidad y Especificidad

Los resultados de las pruebas de sensibilidad y especificidad están resumidas en las Tablas 2 + 3 (ver anexo). Para determinar la sensibilidad se estudiaron un total de 878 muestras con anti-HAV positivo encontrándose una sensibilidad del 98,5 al 100% (ensayo inicial) o de 99,0 a 100% (repetición del test). La reactividad del test para muestras con seroconversión fue estudiada en base a 12 paneles de seroconversión. En este caso, se encontró que el Enzygnost® Anti-HAV muestra, en relación con el reconocimiento de una seroconversión, una sensibilidad que corresponde a la de un test comparable.

La sensibilidad analítica se determinó con relación a un estándar internacional de la OMS con ≤ 20 UI/l.

Independientemente de esto no se puede excluir que para un amplio uso del test algunas muestras no se puedan reconocer. Para determinar la especificidad se investigaron en total 586 muestras de sangre con anti-HAV negativo y se obtuvo una especificidad del 96,6 al 100% (ensayo inicial) o del 98,3 al 100% (repetición del test). Dependiendo, entre otros, del colectivo estudiado, del desarrollo del test, es posible encontrar valores divergentes. De acuerdo al estado actual de los conocimientos, de un resultado positivo al test Anti-HAV no se puede deducir con seguridad, que exista una infección por hepatitis o el que haya una inmunidad, así como, un resultado negativo del test tampoco excluye una infección por hepatitis o el que haya una inmunidad.

Reproducibilidad

Los resultados de la reproducibilidad intra / inter -assay están resumidos en la Tabla 4 (en el anexo). En este caso se trata de datos dados como ejemplo. Dependiendo, entre otros, del desarrollo del test son posibles desviaciones de estos valores.

Enzygnost y BEP son marcas de fábrica registradas de Dade Behring Marburg GmbH en USA, Alemania y en otros países.

Dade Behring Marburg GmbH
Emil-von-Behring-Str. 76
D-35041 Marburg
www.dadebehring.com

CE

Tabla 1. Estabilidad y almacenaje

Enzygnost® Anti-HAV

Material/Reactivos	Estado	Almacenamiento	Estabilidad*
Enzygnost® Anti-HAV (placa de prueba/ elementos restantes)	Abierto	entre +2 y +8°C en el envase con cápsulas deshidratantes	6 semanas
Conjugado Anti-HAV/POD	Abierto	entre +2 y +8°C	4 semanas
Tampon para Conjugado	Abierto	entre +2 y +8°C	4 semanas
Conjugado diluido listo para usar	1 + 40	entre +2 y +8°C entre +18 y +25°C	4 semanas 1 semana
Antígeno-HAV	Abierto	entre +2 y +8°C	4 semanas
Suero estándar 80 Anti- HAV Suero control Anti-HAV, negativo	Abierto	entre +2 y +8°C < -20°C	4 semanas 3 meses
Diluciones de estándar Anti-HAV Anti-HAV (40, 20, 10, UI/l)	Después de preparar con suero estándar 80 Anti-HAV recién abierto	entre +2 y +8°C	4 semanas
Chromógeno TMB	Abierto	entre +2 y +8°C	hasta la fecha de vencimiento
Tampón/sustrato TMB	Abierto	entre +2 y +8°C	hasta la fecha de vencimiento
Solución de uso del Cromógeno	1 + 10	entre +2 y +8°C entre +18 y +25°C en recipiente cerrado protegido de la luz	5 días 8 horas
Solución de lavado POD (concentrado)	Abierto 1 : 20 1 : 20	entre +2 y +8°C entre +2 y +8°C entre +18 y +25°C	hasta la fecha de vencimiento 1 semana 1 día
Solución de detenimiento POD	Abierto	entre +2 y +8°C	hasta la fecha de vencimiento

* en ningún caso más allá de la fecha de vencimiento

Tab. 2 Sensibilidad

En la investigación de la sensibilidad en dos centros independientes (K, M) se encontraron los siguientes datos:

Colectivo de muestras	Número de muestras	Reactividad inicial	Reactividad repetida
(M) Anti-HAV pos.	30	30	30
Anti-HAV pos. (plasmas)	30	30	30
Anti-HAV/IgG pos.	157	157	157
Anti-HAV/IgM pos.	84	84	84
Seroconverciones	12	La sensibilidad corresponde a la sensibilidad de un método comparable	
(K) Anti-HAV pos.	204	204	204
Anti-HAV pos.	205	202	203
Anti-HAV pos.	168	166	167

Tab. 3 Especificidad

En la investigación de la especificidad en dos centros independientes (K, M) se encontraron los siguientes datos:

Colectivo de muestras	Número de muestras	Reactividad inicial	Reactividad repetida
(M) Sueros normales negativos	50	0	0
Muestras de plasma normal negativas	50	0	0
(K) Sueros normales negativos	176	6	3
Sueros normales negativos	310	9	5

Tab. 4 Reproducibilidad

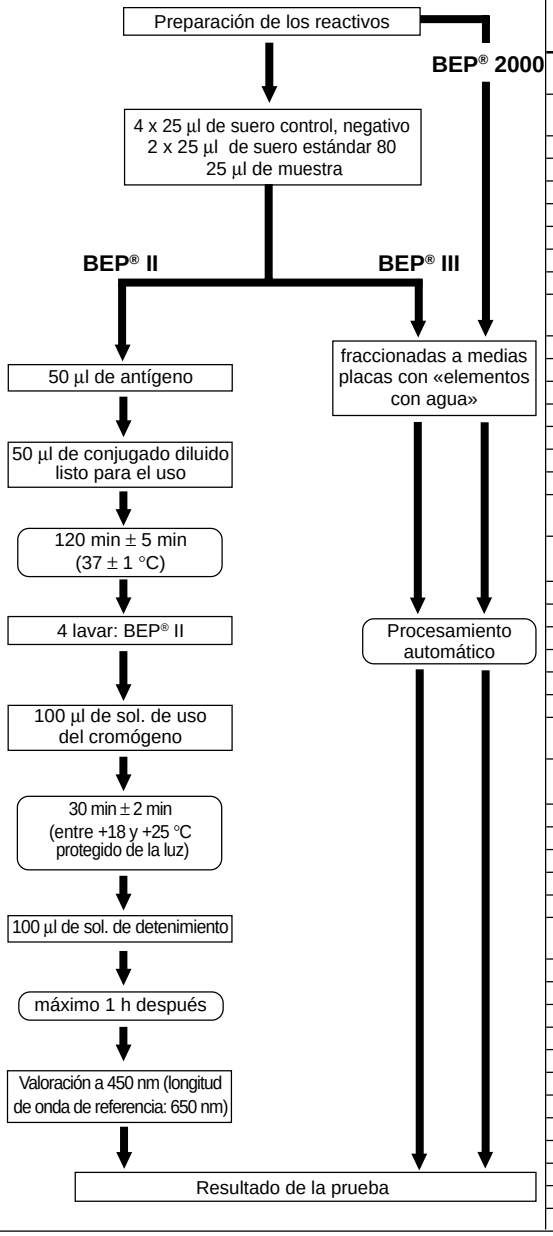
En las investigaciones de la reproducibilidad se estudiaron las muestras 5 días cada una en determinaciones óctuplas. El cálculo del coeficiente de variación (CV) se efectúo de acuerdo al modelo de componentes de varianza.

Muestra	Valor promedio de extinción (E)	% CV	
		Intra assay	Inter assay
F1	1,203	3,6	7,8
F2	0,607	5,0	9,2
F3	0,331	9,4	7,8
F4	0,115	8,3	16,6

Tabla 5 Realización de la prueba y programación

Enzygnost® Anti-HAV

Procedimiento (BEP® II, BEP® III, BEP® 2000)


Preparación de los reactivos
BEP® 2000
4 x 25 µl de suero control, negativo
2 x 25 µl de suero estándar 80
25 µl de muestra
BEP® II
BEP® III
50 µl de antígeno
fraccionadas a medias placas con «elementos con agua»
50 µl de conjugado diluido listo para el uso
120 min ± 5 min (37 ± 1 °C)
4 lavar: BEP® II
Procesamiento automático
100 µl de sol. de uso del cromógeno
30 min ± 2 min (entre +18 y +25 °C protegido de la luz)
100 µl de sol. de detenimiento
máximo 1 h después
Valoración a 450 nm (longitud de onda de referencia: 650 nm)
Resultado de la prueba

Programación para el

BEP® II

MENU NO	
OPERATE 1	YES
DOSIFICACIÓN DEL ANTÍGENO	
WASHINGS	0
ASPIRATE	NO
SOAKTIME	0
DISP VOL	50
CHANNEL NO	3
PHOT	NO
OPERATE 2	YES
DOSIFICACIÓN DEL CONJUGADO	
WASHINGS	0
ASPIRATE	NO
SOAKTIME	0
DISP VOL	50
CHANNEL NO	2
PHOT	NO
OPERATE 3	YES
LAVADO E Y DOSIFICACIÓN DEL CHROMÓGENO	
WASHINGS	4
ASPIRATE	NO
SOAKTIME	0
DISP VOL	100
CHANNEL NO	4
PHOT	NO
OPERATE 4	YES
DOSIFICACIÓN SOLUCIÓN DE DETENIMIENTO	
WASHINGS	0
ASPIRATE	NO
SOAKTIME	0
DISP VOL	100
CHANNEL NO	5
PHOT	YES
MEAS WL	450
REF WL	650
BLK COR	NO
EVAL MODE	4
GEN CUT	NO
NEG CONT	4
MAX NEG	-
MIN NEG	0.700
FACT NEG	0.5
MAX POS	0.300
THRESH	-
CUT OFF	-

Enzygnost® Anti-HAV

Campo de aplicação

Teste imunoenzimático para detecção de anticorpos contra o antigénio do vírus da hepatite A no soro e no plasma.

O processamento do teste imunoenzimático efectua-se nos processadores ELISA BEP® II, BEP® III e BEP® 2000. O teste foi desenvolvido para a análise de amostras individuais, não de amostras pool ou diluídas. O produto só pode ser utilizado para fins de diagnóstico *in vitro*.

Significado diagnóstico

O Anti-HAV é sempre detectável no início de uma doença com hepatite A (1,2,3,4) e, na maior parte dos casos, já em elevada actividade. Por isso, um resultado negativo no paciente exclui da doença a etiologia da hepatite A. Uma vez que, após uma infecção, o Anti-HAV permanece detectável durante toda a vida, a sua detecção garante a existência de uma imunidade, o que constitui um critério essencial quando se coloca a questão de uma imunização activa por vacinação ou administração de imunoglobulinas como profilaxia da pós-exposição, em caso de risco de contacto.

Mediante uma valoração quantitativa na base de soro standard Anti-HAV (curva de calibração), o Enzygnost® Anti-HAV permite obter a determinação quantitativa do teor de anticorpos anti-HAV expresso em UI/l, segundo o standard internacional da OMS.

Princípio metodológico

O Enzygnost® Anti-HAV é um teste imunoenzimático baseado no princípio competitivo. Os anticorpos específicos da amostra sob teste e os anticorpos monoclonais anti-HAV conjugados com POD entram em competição pela fixação sobre o antigénio HAV, que é adicionado também como componente da reacção a este teste de uma só etapa. Consoante a concentração do anticorpo específico da amostra, a quantidade de conjugado que se aglutina com o antigénio será maior ou menor.

O imunocomplexo assim formado aglutina-se aos anticorpos específicos HAV fixados à superfície da placa de microtitulação.

Após eliminação, por lavagem, dos componentes não aglutinados, é determinada a actividade enzimática aglutinada do conjugado. A transformação enzimática do substrato e cromogénio (reacção cromática azul) é interrompida por adição da solução de bloqueio POD (reacção cromática amarela). A intensidade cromática é inversamente proporcional à concentração de anticorpos existente na amostra.

Reagentes

Conteúdo da embalagem comercial

Enzygnost® Anti-HAV	*1 x 96*
Enzygnost® Anti-HAV placa de ensaio	1 unidade
Anti-HAV/Conjugado POD	1 x 0,4 ml
Tampão para conjugado (Anti-HAV)	2 x 6 ml
Antigene HAV	2 x 6 ml
Soro standard 80 Anti-HAV	1 x 0,5 ml
Soro de controlo negativo Anti-HAV	1 x 6 ml
Solução de lavagem POD (concentrado)	1 x 100 ml
Tampão/Substrato TMB	1 x 30 ml
Cromogénio TMB	1 x 3 ml
Solução de bloqueio POD	1 x 100 ml
Frasco vazio para solução de uso cromogénio	1 unidade
Películas aderentes	6 unidades
Bolsa de polietileno para conservar as fileiras de poços não utilizadas	1 unidade
Tabela de valores do código de barras	1 unidade
Folheto da embalagem	1 unidade

Composição

Enzygnost® Anti-HAV (placa de ensaio)

Placa de microtitulação revestida de anticorpos humanos contra o antigene do vírus da hepatite A.

Conjugado Anti-HAV/POD

Anti-HAV monoclonal (rato), conjugado com peroxidase (POD) em solução tampão Tris (0,05 mol/l)
Diluição de uso: 1+ 40 em tampão para conjugado (Anti-HAV)
Conservante: Fenol (máx 1g/l).

Tampão para conjugado (Anti-HAV) como meio de diluição para o conjugado Anti-HAV/POD:

Contém glicerina (100g/l), Tween 20 (20 g/l), cloreto de sódio (8,8 g/l), EDTA (1,9 g/l), albumina bovina (1 g/l), poligelina e fosfato (50 mmol/l)
Conservante: Fenol (máx. 1 g/l)

Antigene HAV:

Antigene do vírus da hepatite A obtido de fibroblastos humanos, inactivado.
Conservante: Fenol (máx. 1 g/l)

Soro standard Anti-HAV 80:

Soro humano com anticorpos contra o HAV (nominalmente 80 ± 20 IU/l), baseado no preparado de referência da OMS
Valor indicativo de extinção ≤ 0,3 E
Conservante: Fenol (máx. 1 g/l)

Soro de controlo Anti-HAV, negativo:

Soro humano sem anticorpos contra o HAV
Valor indicativo de extinção ≥ 0,7
Conservante: Fenol (máx. 1 g/l)

Solução de lavagem POD (concentrado):

Solução tampão de fosfato (90 mmol/l) contendo Tween (18 g/l)
Conservante: Fenol (máx. 1 g/l)

Tampão/Substrato TMB:

Peróxido de hidrogénio (aprox. 0,1 g/l) em solução tampão de acetato (25 mmol/l)
Conservante: n-butanol (máx. 1 %)

Cromogénio TMB:

Diidrocloreto de tetrametilbenzidina (5 g/l)

Solução de bloqueio POD: Ácido sulfúrico 0,5 N

Os reagentes (com excepção da solução de lavagem POD, da solução de bloqueio POD e da solução de uso cromogénio preparada a partir dos reagentes específicos de cada lote com Cromogénio TMB e Tampão/substrato TMB) só podem ser utilizados como constituintes de um mesmo lote, ou seja, somente na combinação de 6 cifras (n.º de lote) que vem impressa na embalagem e indicada na tabela de código de barras adjunta.

Advertências e medidas de precaução

1. Só para uso diagnóstico *in-vitro*
2. Cada dádiva individual de sangue destinada à preparação de soros standard e de controlo foi previamente examinada com vista à detecção de HBsAg, Anti-HCV, Anti-HIV1 e Anti-HIV2. Na elaboração só foram utilizadas doações com resultado negativo. Independentemente disso, todos os materiais obtidos a partir de sangue humano devem ser manuseados com as precauções necessárias, seguindo as medidas de segurança recomendadas em caso de risco biológico, uma vez que nunca se pode excluir inteiramente o risco de contaminação por agentes patogénicos. (5).
3. O antigene HAV isolado de fibroblastos humanos é submetido a um reconhecido processo de inactivação do vírus (transformação com β-propiolactona). Não obstante, por razões de segurança, deve usar-se de toda a cautela ao manipular o vírus HAV (5).
4. Recomenda-se o uso de luvas de protecção durante toda a execução do teste.
5. Para a desinfecção de materiais sólidos, é aconselhável proceder a uma autoclavagem durante pelo menos 1 hora a uma temperatura de, pelo menos, + 121º C. Todas as soluções aspiradas devem ser recolhidas em dois recipientes ligados em série. Os recipientes devem conter um desinfectante apropriado para a inactivação de vírus patogénicos humanos; é necessário seguir as concentrações e tempos de reacção indicados pelo fabricante.

Preparação dos reagentes

Antes de iniciar o teste, levar todos os reagentes e amostras à temperatura de + 18 a + 25°C, **mas não** tirar a placa de ensaio do seu recipiente.

Por cada placa de ensaio, diluir **20 ml da solução de lavagem POD** (concentrado) com água destilada ou desionizada até obter **400 ml**.

Solução de uso do cromogénio: Diluir, por placa, **1 ml de cromogénio TMB** com **10 ml de tampão/ substrato TMB** no frasco de plástico vazio fornecido em conjunto e conservá-lo fechado e protegido contra a luz. Depois do uso, lavar o frasco meticulosamente com água destilada.

Por razões técnicas que se prendem com o sobreenchimento dos frascos, não é permitido verter conjuntamente os conteúdos dos frascos de cromogénio TMB e de tampão/substrato TMB.

Para a **execução quantitativa do teste**, é necessário preparar a partir do soro standard Anti-HAV 80, as seguintes diluições **negativas** com o **soro de controlo Anti-HAV**:

40 IU/l: Diluição de 1:2 (p. ex., 100 µl de soro standard Anti-HAV 80 + 100 µl de soro de controlo Anti-HAV, negativo).

20 IU/l: Diluição de 1:4 (p. ex., 100 µl do standard 40 IU/l + 100 µl de soro de controlo Anti-HAV, negativo).

10 IU/l: Diluição de 1:8 (p. ex., 100 µl do standard 20 IU/l + 100 µl de soro de controlo Anti-HAV, negativo.

Para as **concentrações expectáveis de Anti-HAV** ≥ **60 IU/l**, os **soros ou plasmas** têm de ser diluídos da seguinte maneira:

Até 600 IU/l diluição de 1:11 (p. ex., 10 µl de amostra + 100 µl de soro de controlo Anti-HAV negativo).

Até 6 000 IU/l diluição de 1:101 (p. ex., 10 µl de amostra + 1 000 µl de soro de controlo Anti-HAV, negativo).

Até 60 000 IU/l diluição de 1:1 111 (p. ex., 10 µl de amostra + 1 000 µl de soro de controlo Anti-HAV, negativo;

e, a partir daí, 10 µl + 100 µl de soro de controlo Anti-HAV, negativo).

Todas as etapas de diluição necessárias só deverão ser executadas, de forma negativa, com o correspondente soro de controlo Anti-HAV.

Solução de uso do conjugado: Retirar a quantidade necessária de conjugado Anti-HAV/POD e diluir a 1 + 40 com o tampão para conjugado Anti-HAV. [Adicionar, por placa de ensaio, 150 µl de conjugado Anti-HAV/POD a um frasco original (6 ml) de tampão para conjugado (Anti-HAV).]

Estabilidade e condições de conservação

Não abertos e se conservados entre +2 e + 8°C, todos os componentes da embalagem combinada Enzygnost® Anti-HAV podem ser utilizados até ao termo dos prazos de validade indicados nos rótulos.

A estabilidade e condições de conservação dos reagentes abertos ou diluídos para uso podem ser consultados na tabela 1 em anexo.

Instrumentos necessários

BEP® II: Para a execução automática da dosagem de reagentes e passos de lavagem

BEP® III: Para processamento automático e interpretação do teste, após a dosagem das amostras

BEP® 2000: Para o processamento e interpretação do teste de forma integralmente automática.

Pipetas: Pipetas de êmbolo de 25, 50, 100 e 1000 µl

Incubadora: Banho-maria coberto (+37 ± 1°C)

Execução do teste

Execução do teste com BEP® II

1. **Esquema de preparação:**

   Determinar o número necessário de pontos de aplicação (número das amostras a analisar mais 6 poços para controlos). Para a execução do teste, retirar do caixilho de suporte as fileiras de poços desnecessárias e conservá-las para utilização posterior (veja a tabela 1).

   Para a interpretação quantitativa do teste, estabelecer uma curva standard (veja trabalhos preparatórios) em que cada concentração individual é testada em duplicado (neste caso, o número das amostras sob teste mais 12 poços para os controlos e a gama de standards).

2. **Dosagem das amostras**

   Teste qualitativo: Pipetar em cada um dos 4 poços (A1 a D1) 25 µl de soro de controlo Anti-HAV, negativo, em cada um dos 2 poços (E1 e F1) 25 µl de soro standard Anti-HAV 80 e em cada um dos poços seguintes 25 µl de amostra.

   Alternativamente ao esquema de pipetação acima indicado, é permitido também aplicar o soro standard Anti-HAV 80 uma vez no início e outra vez no fim da série de teste.

Esquema de pipetação: Dosear em cada um dos 4 poços 25 µl de soro de controlo Anti-HAV, negativo, num poço 25 µl de soro standard Anti-HAV 80, em cada um dos poços seguintes 25 µl, de amostra e no fim da série de teste ou da placa de ensaio novamente 25 µl de soro standard Anti-HAV 80.

Teste quantitativo: Pipetar em cada um dos 4 poços (A1, A2, B1 e B2) 25 µl de soro de controlo Anti-HAV, negativo e pipetar, seguidamente, em cada um dos 2 poços 25 µl de cada uma das concentrações do soro standard Anti-HAV 80 (C1 e C2), 40 (D1 e D2), 20 (E1 e E2) e 10 (F1 e F2) UI/l. Dosear em cada um dos poços seguintes 25 µl de amostra (consoante a necessidade, eventualmente pré-diluída). Imediatamente após a conclusão da dosagem das amostras, proceder à adição do antigene.

3. **Dosagem de antigene**
   Juntar a cada poço exposto 50 µl de solução de antigénio e passar imediatamente à dosagem de conjugado.
4. **Dosagem de conjugado**
   Acrescentar 50 µl de solução de uso do conjugado, respectivamente, à amostra e ao antigénio (veja a Nota), cobrir a placa de ensaio com película aderente e colocar imediatamente na incubadora.

   Nota:
   Para não adulterar os resultados em caso de execução manual, a dosagem do conjugado deve ser efectuada de tal maneira que a ponta da pipeta não toque no bordo da cavidade, nem mergulhe no líquido da amostra.
5. **Incubação**
   Deixar incubar durante 2 horas ± 5 min aprox. a + 37 ± 1° C, imediatamente a seguir dar início à lavagem.
6. **Lavagem**
   Retirar a película aderente, aspirar o conteúdo de todos os poços e lavar cada um deles 4 vezes com aprox. 0,3 ml de solução de lavagem. Depois das etapas de lavagem passar imediatamente à dosagem de reagentes seguinte para evitar que sequem.
7. **Dosagem de substrato**
   Dosear 100 µl de solução de uso cromogénio em cada poço, cobrir a placa com nova película aderente.
8. **Incubação do substrato**
   Deixar incubar durante 30 ± 2 min protegido contra a luz entre + 18 e + 25° C.
9. **Reacção de bloqueio**
   Retirar a película aderente e acrescentar a cada poço 100 µl de solução de bloqueio POD, mantendo o mesmo ritmo que em 7.
10. **Medição**
    Fazer uma medição fotométrica a 450 nm no espaço de 1 hora. Como comprimento de onda de referência aconselha-se 650 nm (eventualmente entre 615 e 690 nm.

Execução do teste com BEP® III

Para o processamento com o BEP® III, as placas de ensaio têm de ser preparadas até à dosagem de amostras (ponto 1 e 2 de "Execução do teste com BEP® II"). Todas as etapas seguintes de processamento são executadas automaticamente no aparelho (veja Manual de instruções do BEP®). Não cobrir as placas com película aderente. Após a conclusão da dosagem de amostras, colocar a placa imediatamente no BEP® III.

Devido às condições técnicas de base (cadência do aparelho), os tempos de incubação ajustados no software do BEP® III, podem divergir dos tempos de incubação do processamento com o BEP® II, mas foram validados para a combinação BEP® III/Enzygnost®.

Execução do teste com BEP® 2000

A dosagem de amostras e o processamento subsequente do teste realizam-se no aparelhe de forma integralmente automática (veja Manual de instruções do BEP® 2000).

Validação do teste

Os valores individuais de extinção dos soros de controlo servem para cálculo dos valores médios, se:

$$E_{neg.} \geq 0{,}700$$

$$-0{,}010 \leq E_{ST80} \leq 0{,}300$$

Dos valores de extinção do soro de controlo Anti-HAV, negativo, um valor que se situe fora da especificação pode ser desprezado.

Os valores de extinção do soro standard 80 têm de corresponder ambos às especificações. Não estando preenchidas estas condições, é necessário repetir o teste.

Avaliação do teste

As avaliações são efectuadas automaticamente com o BEP® 2000 ou o BEP® III. Para o efeito, favor consultar os manuais de instruções. Em caso de avaliação efectuada sem a assistência de software, é necessário prestar atenção aos seguintes capítulos.

Teste qualitativo

O valor médio negativo dos valores de extinção do soro de controlo Anti-HAV é calculado a partir dos valores de extinção do soro de controlo Anti-HAV. Para o cálculo do valor-limite multiplica-se o valor médio de extinção do soro de controlo Anti-HAV, negativo pelo factor 0,5.

$\bar{E}$ neg. x 0,5 = valor-limite (cut off)

Como intervalo de incerteza define-se:

Valor-limite ± 10%

De acordo com os critérios do teste, as amostras da análise são classificadas do seguinte modo:

Testergebnis:

1. $E_{amostra}$ > cut off + 10% = negativo
2. $E_{amostra}$ < cut off - 10% = positivo
3. cut off - 10% ≤ $E_{amostra}$ ≤ cut off + 10% = duvidoso

Amostras que no teste inicial reajam com valores de extinção num intervalo de ± 10% do valor-limite (intervalo de incerteza) têm de ser consideradas provisoriamente duvidosas. Para clarificação do resultado, a amostra terá de ser submetida a um novo teste, mas desta vez numa dupla determinação.

Se, na repetição do teste, o valor médio da dupla determinação for inferior ao valor-limite de - 10% ou superior ao valor-limite de + 10%, o resultado duvidoso inicial pode ser desprezado e a amostra pode ser considerada positiva ou negativa.

Se, mesmo assim, não for possível classificar as amostras como positivas ou negativas, o resultado do teste será ”duvidoso”.

Teste quantitativo:

Para a determinação quantitativa, determinam-se os valores médios de extinção das duplas determinações da série standard de 10, 20, 40 e 80 UI/l.

A concentração de Anti-HAV na amostra é lida com base nesta curva standard.

Se a amostra tiver sido diluída, a concentração lida com base na curva standard tem de ser multiplicada pelo factor de diluição.

Limitações de execução do teste

1. Não pode ser utilizado material de pacientes contendo azida de sódio!
2. As amostras contaminadas por micróbios não devem ser utilizadas.
3. Os anticoagulantes como heparina, EDTA e citrato não influenciam o resultado do teste.
4. As amostras lipémicas, hemolíticas ou que contenham factor reumatóide e ANA ou tenham sido inactivadas pelo calor (1h, 56° C) não prejudicam o teste.
5. O tampão/substrato TMB, a solução de uso cromogénio e a solução de bloqueio POD não devem entrar em contacto com iões de metais pesados, nem substâncias oxidantes (não usar pipetas com partes metálicas condutoras de líquido). Não efectuar as reacções do substrato na proximidade de desinfectantes que contenham hipoclorito.
6. Uma coloração azul espontânea da solução de uso cromogénio antes de esta ser colocada na placa de ensaio é indício de contaminação; deverá então preparar-se uma solução fresca num recipiente limpo. O contacto cutâneo com as soluções acima mencionadas deverá ser evitado.
7. Durante a incubação, a placa de ensaio deverá ser mantida em repouso (p. ex., sobre um dispositivo de flutuação fixo ou em banho-maria sem circulação); neste caso, as cavidades estão em contacto com a água temperada. Se forem utilizados conservantes para evitar a contaminação microbial da água, tomar todo o cuidado para que nem a superfície da placa de ensaio, nem as cuvetes entrem em contacto com estas soluções, uma vez que as contaminações podem originar reacções não específicas.
8. Os soros de controlo são produzidos utilizando soros humanos naturais. Por isso, podem ocorrer turvações que não afectam o resultado do teste.

Características de performance do teste

Sensibilidade e especificidade

Os resultados da análise de sensibilidade e especificidade estão resumidos nas tabelas 2 + 3 (no anexo). Para a determinação da sensibilidade, foi analisado um total de 878 amostras Anti-HAV positivas, tendo sido determinada uma sensibilidade de 98,5 a 100% (teste inicial) e 99,0 - 100% (repetição do teste). Foi analisada a reactividade do teste nas amostras de seroconversão, com base em 12 painéis de seroconversão. Neste caso, em relação à detecção de seroconversões, foi observado que o Enzygnost® Anti-HAV apresenta uma sensibilidade correspondente à sensibilidade de um teste similar. A sensibilidade analítica foi determinada com base num standard internacional da OMS com ≤ 20 IU/l. Independentemente disso, não é de excluir que algumas amostras individuais não escapem à detecção, no caso de uma utilização mais ampla do teste.

Para a determinação da especificidade, foi analisado um total de 586 amostras de sangue Anti-HAV negativas, tendo sido determinada uma especificidade de 96,6 a 100 % (teste inicial) ou 98,3 a 100 % (repetição do teste). Em consequência do colectivo testado, da execução do teste, etc., é possível obter-se valores diferentes. No estado actual de conhecimentos, a partir de um resultado positivo do teste Anti-HAV, não pode inferir-se, com certeza, a presença de uma infecção por hepatite A ou a existência de imunidade, tampouco um resultado negativo do teste permite excluir com segurança a presença de uma infecção por hepatite A ou a existência de imunidade.

Reprodutibilidade

Os resultados referentes à reprodutibilidade intra/inter-ensaio estão resumidos na tabela 4 (no anexo). Neste caso, trata-se de dados averiguados a título de exemplo. É possível obter valores completamente diferentes, dependendo da execução do teste.

Enzygnost e BEP são marcas registadas da Dade Behring Marburg GmbH nos USA, Alemanha e noutros países.

Dade Behring Marburg GmbH
Emil-von-Behring-Str. 76
D-35041 Marburg
www.dadebehring.com

CE

Tab. 1 Estabilidade e condições de conservação

Enzygnost® Anti-HAV

Material/Reagente	Estado	Conservação	Estabilidade*
Enzygnost® Anti-HAV (placa de ensaio / restantes poços)	Após abertura	+2 a +8º C em bolsa com cápsulas secas	6 Semanas
Conjugado Anti-HAV/POD	Após abertura	+2 a +8º C	4 Semanas
Tampão-conjugado	Após abertura	+2 a +8º C	4 Semanas
Conjugado diluído pronto para uso	1 + 40	+2 a +8º C +18 a +25º C	4 Semanas 1 Semana
Antigene HAV	Após abertura	+2 a +8º C	4 Semanas
Soro standard Anti-HAV 80 Soro de controlo Anti-HAV, negativo	Após abertura	+2 a +8º C < -20 °C	4 Semanas 3 Meses
Diluição standard Anti-HAV Verdünnung (40, 20, 10, IU/l)	Após preparação com soro standard Anti-HAV 80 acabado de abrir	+2 a +8º C	4 Semanas
Cromogénio TMB	Após abertura	+2 a +8º C	Até data de validade
Tampão-substrato TMB	Após abertura	+2 a +8º C	Até data de validade
Solução de uso cromogénio	1 + 10	+2 a +8º C +18 a +25º C recipiente fechado, protegido contra a luz	5 Dias 8 Horas
Solução de lavagem POD (concentrado)	Após abertura 1 : 20 1 : 20	+2 a +8º C +2 a +8º C +18 a +25º C	Até data de validade 1 Semana 1 Dia
Solução de bloqueio POD	Após abertura	+2 a +8º C	Até data de validade

* Jamais por um período de tempo para além da data de validade!

Tab. 2 Sensibilidade

Para as análises de sensibilidade, foram determinados os seguintes dados em dois centros independentes (K, M):

Colectivo de amostras	N.º de amostras	Inicialmente reactiva	Repetição reactiva
(M) Anti-HAV pos.	30	30	30
Anti-HAV pos. (plasmas)	30	30	30
Anti-HAV/IgG pos.	157	157	157
Anti-HAV/IgM pos.	84	84	84
Seroconversões	12	A sensibilidade corresponde à sensibilidade de um teste similar	
(K) Anti-HAV pos.	204	204	204
Anti-HAV pos.	205	202	203
Anti-HAV pos.	168	166	167

Tab. 3 Especificidade

Para as análises de especificidade, foram determinados os seguintes dados em dois centros independentes (K, M):

Colectivo de amostras	N.º de amostras	Inicialmente reactiva	Repetição reactiva
(M) soros normais negativos	50	0	0
amostras de plasma normal negativas	50	0	0
(K) soros normais negativos	176	6	3
soros normais negativos	310	9	5

Tab. 4 Reprodutibilidade

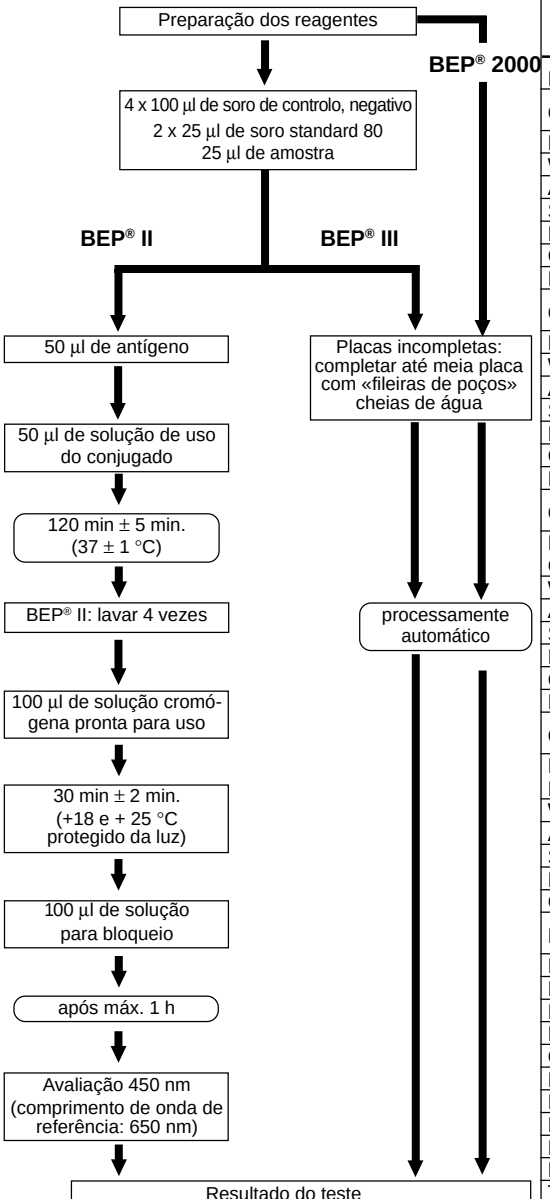
Para as análises de reprodutibilidade as amostras foram testadas sempre com determinações de 8 vezes, durante 5 dias. O cálculo dos coeficientes de variação (CV) foi efectuado de acordo com o modelo de componentes de variância.

Amostra	Valor médio de extinção (E)	% CV	
		Intra-ensaio	Inter-ensaio
F1	1,203	3,6	7,8
F2	0,607	5,0	9,2
F3	0,331	9,4	7,8
F4	0,115	8,3	16,6

Tab. 5 Realização e programação do ensaio

Enzygnost® Anti-HAV

Realização (BEP® II, BEP® III, BEP® 2000)


Preparação dos reagentes
BEP® 2000
4 x 100 µl de soro de controlo, negativo
2 x 25 µl de soro standard 80
25 µl de amostra
BEP® II
BEP® III
50 µl de antígeno
Placas incompletas: completar até meia placa com «fileiras de poços» cheias de água
50 µl de solução de uso do conjugado
120 min ± 5 min. (37 ± 1 °C)
BEP® II: lavar 4 vezes
processamente automático
100 µl de solução cromó-gena pronta para uso
30 min ± 2 min. (+18 e + 25 °C protegido da luz)
100 µl de solução para bloqueio
após máx. 1 h
Avaliação 450 nm (comprimento de onda de referência: 650 nm)
Resultado do teste

Programação do Menu para o

BEP® II	
MENU NO	
OPERATE 1	YES
DOSAGEM DO ANTÍGENO	
WASHINGS	0
ASPIRATE	NO
SOAKTIME	0
DISP VOL	50
CHANNEL NO	3
PHOT	NO
OPERATE 2	YES
DOSAGEM DO CONJUGADO	
WASHINGS	0
ASPIRATE	NO
SOAKTIME	0
DISP VOL	50
CHANNEL NO	2
PHOT	NO
OPERATE 3	YES
LAVAGEM E DOSAGEM DO CROMOGÉNEO	
WASHINGS	4
ASPIRATE	NO
SOAKTIME	0
DISP VOL	100
CHANNEL NO	4
PHOT	NO
OPERATE 4	YES
DOSAGEM DA SOLUÇÃO DE BLOQUEIO	
WASHINGS	0
ASPIRATE	NO
SOAKTIME	0
DISP VOL	100
CHANNEL NO	5
PHOT	YES
MEAS WL	450
REF WL	650
BLK COR	NO
EVAL MODE	4
GEN CUT	NO
NEG CONT	4
MAX NEG	-
MIN NEG	0.700
FACT NEG	0.5
MAX POS	0.300
THRESH	-
CUT OFF	-

Bibliography/Literatur/Littérature/Bibliagrafia/Bibliografía/Bibliografia

1. R. H. Purcell (1994) Hepatitis viruses: Changing patterns of human disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91:** 2401-2406
2. E. E. Mast, M. J. Alter (1993) Epidemiology of viral hepatitis: an overview. Virology **4:** 273-283
3. S. M. Lemon, B. H. Robertson (1993) Current perspectives in the virology and molecular biology of hepatitis A virus. Virology **4:** 285-295
4. S. M. Lemon, L. N. Binn (1983) Serum neutralizing antibody response to hepatitis A virus. J. Infect. Dis. **148:** 1033-1039
5. U.S. Department of Health and Human Services CDC, Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, HHS Publication (CDC) 93-8395; 1999; Section II; 8-16

	Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des Symboles / Interpretazione simboli / Clave de los Símbolos / Chave dos Símbolos
	Manufactured by / Hergestellt von / Fabriqué par / Prodotto da / Fabricado por
IVD	*In Vitro* Diagnostic Medical Device / *In Vitro* Diagnosticum / Dispositif Médical Diagnostic *In Vitro* / Dispositivo Medico per Diagnostica *In Vitro* / Producto sanitario para Diagnóstico *In Vitro*
LOT	Lot Number / Chargenbezeichnung / Numéro de Lot / Numero di Lotto / Número de Lote
EXP CCYY-MM-DD	Expiration Date / Verfalldatum / Date de Péremtion / data di scadenza / Fecha de vencimiento / termo da validade
	Storage Temperature / Lagertemperatur / Température de Conservation / Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento / Temperatura de armazenagem
CE	CE Mark / CE-Zeichen / Marquage CE / Marchio CE / CE Marca / Marca CE
REF	Catalogue Number / Katalog Nummer / Référence / Codice Catalogo / Número de Catálogo
	Consult Instructions for Use / Gebrauchsanweisung beachten / Consulter la Notice d'Utilisation / Istruzioni per l'uso / Consultar Instucciones para el Uso / Consulte as Instruções de Utilização